

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Antonio Cardoso de Andrade

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADRENALINA E
NORADRENALINA SOBRE A ADESÃO DE
STREPTOCOCCUS MUTANS EM BRAQUETES
ORTODÔNTICOS**

Taubaté - SP
2010

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Antonio Cardoso de Andrade

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADRENALINA E
NORADRENALINA SOBRE A ADESÃO DE
STREPTOCOCCUS MUTANS EM BRAQUETES
ORTODÔNTICOS**

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté.

Área de concentração: Biologia Odontológica

Orientador: Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco

Co-orientadora: Profa. Dra. Sheila Cavalca Cortelli

Taubaté - SP
2010

ANTONIO CARDOSO DE ANDRADE

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Universidade de Taubaté

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Universidade _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Universidade _____

Assinatura: _____

Dedico este trabalho...

... a Deus e aos meus netos que me dirigiram a luz, e aos demais membros da minha família, inclusive o bivô Kride e a bivó Tereza.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Taubaté, em nome da Reitora Profa. Dra. Maria Lucila Junqueira Barbosa;

Ao Pro-Reitor de pesquisa Prof. Dr. José Roberto Cortelli

À Coordenadora do Programa de Mestrado e Doutorado em Odontologia Profa. Dra. Ana Christina Claro Neves;

Em especial ao meu orientador Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco que sempre teve muita paciência, dedicação e generosidade em todos os momentos da construção deste trabalho;

A minha Co-orientadora Profa. Dra. Sheila Cavalca Cortelli, por toda ajuda e ensinamento;

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP2009/16324-4) pelo auxílio concedido, permitindo assim a execução do trabalho.

A todos os Professores que fizeram parte desta minha formação: Ana Christina Claro Neves, Ana Lia Anbinder, Denise Pontes Raldi, Laís R. da Silva Concílio, Leonardo Gonçalves Cunha, Marcos Augusto do Rego, Maria Rozeli Quirino, Mariella Vieira P. Leão, Priscila C. Suzy Liporoni, Sandra Márcia Habitante, Silvana S. F. dos Santos, Lucilene H. Ricardo, Vanessa Gobbo, Wilson Saad, Maximiliano Neisser, Edna M. Querido de Oliveira Chamon; Marinella Holzhausen e Karina Cogo.

À Adriana Pelligia e a todo o pessoal da secretaria, bem como os funcionários da Faculdade de Odontologia da Universidade de Taubaté – SP;

Aos meus amigos de jornada Vanilda Santos e Prof. Marco Mammoli, aos quais devo tudo pelo inestimável incentivo;

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen e doutoranda Myrella Lésio Castro, grandes responsáveis pela conclusão deste trabalho.

À Bibliotecária Regina Márcia Cuba que fez da correção desta obra, um ato carinhoso de ensinar.

Andrade AC. Avaliação do efeito da adrenalina e da noradrenalina sobre a adesão de *Streptococcus mutans* em braquetes ortodônticos [Dissertação de mestrado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2010. 35p.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito da adrenalina e da noradrenalina sobre a adesão de *Streptococcus mutans* em braquetes ortodônticos. **Método:** Para esta finalidade, braquetes ortodônticos foram distribuídos em poços (microplaca com 96 poços com fundo cônico) contendo 10^5 ufc/ml de *S. mutans*. Os braquetes foram divididos em três grupos (n=12/grupo): (1) 12 poços contendo noradrenalina (50 μ M); (2) 12 poços contendo adrenalina (100 μ M) e (3) 12 poços contendo NaCl 0,9% (controle). Após o período experimental (24 horas, 37°C), os microrganismos não aderidos foram removidos e os braquetes submetidos à sonicação para o desprendimento de *S. mutans* aderidos, possibilitando assim a contagem microbiana (ufc/ml). **Resultados:** Ambas as substâncias testadas (adrenalina e noradrenalina) aumentaram significativamente ($p < 0,05$) a adesão de *S. mutans* aos braquetes ortodônticos. **Conclusão:** Os achados do presente estudo sugerem que a adrenalina e a noradrenalina podem contribuir para um aumento na adesão de *S. mutans* à braquetes ortodônticos, tornando-se assim um possível fator de risco para o desenvolvimento da doença cárie. **Palavras-chave:** Biofilmes; Braquetes ortodônticos; Cárie dentária; Catecolaminas; Estresse fisiológico; *Streptococcus mutans*.

Andrade A C. To evaluate the effect of adrenaline and noradrenaline on the adhesion of *Streptococcus mutans* on orthodontic brackets. [Dissertação de mestrado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2010. 35p.

ABSTRACT

Aim: To evaluate the effect of adrenaline and noradrenaline (hormone/neurotransmitter released during the stress) on the adhesion of *Streptococcus mutans* on orthodontic brackets. **Methods:** Orthodontic brackets were placed in wells (96-well plates) containing 10^5 cfu/mL of *S. mutans*. The brackets were divided into three groups (n=12/group): (1) 12 wells containing noradrenaline (50 μ M); (2) 12 wells containing adrenaline (100 μ M) and (3) 12 wells containing NaCl (0.9%) – control. After the experimental period (24 hours, 37°C), the non-adherent bacteria were removed and the adherent *S. mutans* were detached by sonication and counted (cfu/mL). **Results:** Both adrenaline and noradrenaline significantly increased ($p < 0,05$) the adhesion of *S. mutans* on orthodontic brackets compared to control group. **Conclusions:** The findings of the present study suggest that adrenaline and noradrenaline can improve the adhesion of *S. mutans* to orthodontic brackets, acting as a risk factor to the development of caries.

Keywords: Biofilms; Orthodontic brackets; Caries; Catecholamines; Psychological stress; *Streptococcus mutans*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	11
	2.1 BIOFILME	11
	2.2 A DOENÇA CÁRIE	12
	2.3 <i>S. MUTANS</i> : FATORES DE VIRULÊNCIA	14
	2.4 TRATAMENTO ORTODÔNTICO COMO FATOR DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA CÁRIE	15
	2.5 ESTRESSE	16
3	PROPOSIÇÃO	18
4	MÉTODOLOGIA	19
	4.1 PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA	19
	4.2 DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E PREPARO DAS SOLUÇÕES TESTES	19
	4.3 TESTE DE ADESÃO	20
5	RESULTADOS	24
6	DISCUSSÃO	25
7	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

O biofilme é uma estrutura complexa que se acumula nos tecidos duros quando em ambiente úmido. Muitas espécies de microrganismos encontram-se presentes no biofilme em decorrência de mecanismos de adesão específicos. A placa bacteriana ou dental é atualmente considerada um biofilme verdadeiro, onde diferentes colônias de microrganismos se agrupam em um ecossistema próprio (Costerton et al., 1999).

Dentre os diferentes microrganismos que podem formar o biofilme bucal, o *Streptococcus mutans* apresenta-se como um componente chave nesta colonização, uma vez que estudos atribuem uma reação direta deste mecanismo com o desenvolvimento da doença cárie através da adesão deste ao esmalte, os quais contribuem para o processo de desmineralização observada nesta patologia (Marsh, 1994).

Com o advento da grande procura pelas correções estéticas e funcionais das arcadas dentárias, através de aparatologias fixas, o uso de braquetes favorece a retenção e o acúmulo do biofilme dentário, dificultando a limpeza, aumentando assim o risco de cárie e doenças periodontais. As lesões pontuais brancas, proveniente da desmineralização do esmalte são fortemente intensificadas pela ligação e adesão bacteriana e a formação destas placas sobre os braquetes (Faltermeier et al., 2008).

O estresse é uma patologia em ascensão devido aos hábitos de vida contemporâneos, no qual o organismo reage a este processo com alteração do padrão fisiológico normal. Estudos demonstram que níveis elevados de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e glicocorticóides apresentam-se

elevados durante este processo. O relacionamento entre estresse e progressão de doenças infecciosas no homem e nos animais tem sido o foco de estudos intensos na última década (Peterson et al., 1991).

Os microrganismos possuem a propriedade de reconhecer os hormônios de seus hospedeiros e utilizá-los para sua adaptação e distribuição. A noradrenalina e adrenalina são detectáveis durante as respostas ao estresse humano, podendo ser causada por estímulos ambientais e atuando no ambiente bucal, alterando o crescimento individual de microrganismos e de seu biofilme subgengival. A liberação das catecolaminas aumenta em até dez vezes a resposta ao estresse, mas o conceito de que organismos infecciosos podem também responder a esses hormônios tem sido raramente considerados, todavia a presença das catecolaminas tem mostrado profundos efeitos no crescimento e na expressão de fatores da virulência de um grande número de microrganismos patogênicos (Lyte et al., 1997; Freestone et al., 2000; Roberts et al., 2005).

Desta forma o objetivo deste estudo foi avaliar se a adrenalina e a noradrenalina (substâncias liberadas durante o estresse) poderiam alterar o perfil de adesão de *S. mutans* em braquetes ortodônticos, representando assim, um fator de risco adicional para usuários da aparatologia ortodôntica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIOFILME

O biofilme bacteriano é definido atualmente como uma comunidade diversa de microrganismos encontrada em qualquer superfície, embutidas em uma matriz extracelular de polímeros (Marsh, 1994). O termo “biofilme” é usado para descrever comunidades de microrganismos ligados a uma superfície. Tais microrganismos são em geral especialmente organizados em uma estrutura tridimensional e incluídos em uma matriz de material extracelular derivada do metabolismo das células e do meio ambiente.

As bactérias crescem e sobrevivem em comunidades organizadas (Biofilmes) em seu ambiente natural. Podem ter várias formas de apresentação como flocos em suspensão, películas na superfície dos líquidos ou submersos; as comunidades bacterianas podem se desenvolver em todas as superfícies sejam sólido-líquidas ou ar-líquido (Jenkinson & Lappin-Scott, 2000).

Diversos e criteriosos estudos têm demonstrado ao longo do tempo que a microbiota bucal é responsável pelas duas principais doenças bucais no ser humano: a cárie dental e as periodontites (Nishihara & Koseki, 2004).

A placa cariogênica é dominada por microrganismos Gram-positivos, incluindo o *Streptococcus sanguinis*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius* e *Lactobacilli*, enquanto a placa periodontopatogênica é formada primariamente pelas bactérias anaeróbias Gram-negativas, como *Aggregatibacter* (antigo *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter spp*, *Capnocytophaga*

spp, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola* (Aas et al., 2005).

2.2 A DOENÇA CÁRIE

Dentre as diferentes espécies que compõem o biofilme bacteriano oral, os estreptococos do grupo *mutans* são considerados os principais relacionados com a cárie dental, devido a sua propriedade de se aderir nas superfícies dentais e iniciar a formação da placa bacteriana cariogênica (Bowen, 2002).

A manifestação de doença cárie é um processo patológico que ocorre por desmineralização do esmalte em consequência de uma interação entre bactérias presentes na cavidade bucal, superfícies dentais e constituintes da dieta, especialmente a sacarose. Assim, a progressão da doença cárie depende de um hospedeiro suscetível, uma microbiota patogênica e uma dieta rica em carboidratos, interagindo em condições críticas num determinado período de tempo (Yazaki et. al., 1999; Petti & Hausen, 2000; Fejerskov et al., 2008).

S. mutans é uma espécie de bactérias anaeróbica facultativa, Gram-positivas com morfologia de coco, pertencentes ao gênero dos Streptococcus (grupo A de Lancefield). *S. mutans* são descritos como estreptococos “mutantes” visto que apresentavam morfologia celular mais achatada que outros. Os estreptococos do grupo *mutans* foram isolados inicialmente no início do século XX, em crianças inglesas.

Este grupo de microrganismo mede cerca de 0,5 a 0,75µm de diâmetro, agrupa-se aos pares ou em cadeias, requerendo meios nutricionalmente ricos para seu crescimento, são anaeróbios facultativos e sua temperatura ótima de

crescimento é de 37 °C. Em meio de cultura Ágar Mitis Salivarius, formam colônias pequenas, fortemente aderidas ao meio de cultura, e com bordas irregulares. Com adição de sacarose ao ágar, muitas linhagens de *S. mutans* produzem colônias de cerca de 1mm de diâmetro. Quando cultivados em ágar sangue em microaerofilia por 48 horas, as colônias de *S. mutans* apresentam-se brancas ou cinzas, circulares ou irregulares, tendendo aderir na superfície do ágar (Grönroos, 2000; Koneman et al., 2001).

Devido ao seu sistema metabólico, esse microrganismo gera um nicho acidogênico que extrapola a capacidade tampão salivar, afetando a camada mineral da superfície dentária, provocando a desmineralização e iniciando o processo da cárie (Carlsson et al., 1985; Castro & Mochidome, 2000).

Na ecologia bucal, vários fatores relacionados, são atribuídos a condições que favorecem o estabelecimento e multiplicação de *S. mutans* na cavidade oral. As características locais (ambiente) e uma dieta rica em açúcares são as mais relevantes. Os estreptococos do grupo *mutans* têm sido encontrados em praticamente todos os indivíduos desde ausência, pouca ou alta prevalência de cárie (Carlsson et al., 1985).

A dieta com alto teor de açúcares, acrescida de pouca qualidade e frequência de higiene bucal, é fundamental para desenvolver a cárie. Esta é uma das doenças infecciosas, transmissíveis mais prevalentes em humanos e uma das mais dispendiosas com relação ao tratamento sintomático restaurador (Loesche, 1986).

2.3 *S. MUTANS*: FATORES DE VIRULÊNCIA

O termo virulência é descrito como a capacidade de um microrganismo causar doenças em um hospedeiro. A relação entre hospedeiro e microrganismo tem sua dinâmica, dependente de suas características individuais e do inter relacionamento com fatores externos. A virulência de uma bactéria consiste em propriedades que promovem sua entrada, colonização e crescimento no hospedeiro. O microrganismo *S. mutans* é comumente associado com o início e desenvolvimento da doença cárie devido aos seus fatores de virulência relacionados (Hamada & Slade, 1980; Loesche, 1986; Gibbons, 1994)

S. mutans está diretamente associado ao desenvolvimento da doença cárie, principalmente por possuir propriedades acidúricas (manter a viabilidade, sobrevivendo assim em meio ácido) e acidogênicas (produção de ácidos) (Hamada & Slade, 1980; Loesche, 1986; Fozo & Quivey, 2004).

A propriedade de sobreviver em meio ácido é associada com a atividade de uma importante enzima localizada na membrana celular, denominada F-ATPase, a qual é responsável pela atividade translocadora de prótons (H^+) do meio intracelular para o extracelular em *S. mutans*, mantendo assim, os valores internos do pH dentro de uma faixa aceitável para a sobrevivência deste microrganismo. A produção de ácidos, principalmente o ácido láctico, acarreta uma redução do pH do biofilme bacteriano (valores menores do que 5,0) promovendo assim, uma desmineralização do esmalte dentário (Kobayashi, 1985; Bender et al., 1986; Loesche, 1986; Quivey et al., 2000; Kuhnert et al., 2004).

Em acréscimo, *S. mutans* são capazes de metabolizar a sacarose em glucanos solúveis e insolúveis em água, pela ação de três subtipos da enzima

glicosiltransferase-GTF [1- glicosiltransferase-B (GTF-B, 162kDa): síntese de glucanos insolúveis; 2-glicosiltransferase-C (GTF-C, 149kDa): síntese de glucanos insolúveis e solúveis e 3- glicosiltransferase-D (GTF-D, 155kDa): síntese de glucanos solúveis]. Os glucanos provenientes desta reação são descritos como os principais responsáveis pelo mecanismo de adesão bacteriana à estrutura dentária (Hanada & Kuramitsu, 1989; Matsumura et al., 2003).

2.4 TRATAMENTO ORTODÔNTICO COMO FATOR DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA CÁRIE

A procura por tratamentos odontológicos estéticos vem aumentando nos últimos anos. Neste contexto, o ramo da ortodontia representa umas das áreas mais atuantes por esta “nova” tendência. Através do emprego de uma aparatologia fixa e/ou móvel, a ortodontia tem como objetivo o restabelecimento da função mastigatória adequada combinada com a busca por um sorriso harmônico.

Porém, a literatura odontológica sugere que o tratamento ortodôntico através do uso de uma aparatologia fixa (braquetes) tem promovido um aumento no acúmulo de placa local, tornando assim um possível fator de risco para o desenvolvimento da doença cárie (Rosenbloom & Tinanoff, 1991; Ahn et al., 2005).

A prevalência de descalcificação do esmalte e lesão branca pode aumentar em cerca de 50% em pacientes usuários de aparelhos ortodônticos (Gorelick et al., 1982; Ahn et al., 2005). Isto se deve ao fato dos braquetes possuírem um “design” estrutural retentivo que aumenta a formação de biofilme (atuando assim, como um “reservatório” bacteriano), além de dificultar o processo de higienização (Brusca et al., 2007; Papaioannou et al., 2007).

Em acréscimo a este fator local, alterações na cavidade bucal, como uma diminuição no pH, também foi relatado em usuários de braquetes ortodônticos (Mitchell, 1992). Em particular, os braquetes metálicos são relacionados com as maiores taxas de desmineralização por possuírem uma tensão superficial crítica para a adesão bacteriana (Eliades et al., 1995; Ahn et al., 2002).

2.5 ESTRESSE

O estresse, definido como um conjunto de reações do organismo a agressões de ordem física, psíquica, infecciosa e outras, capazes de quebrar a homeostase fisiológica, é associada como um potencial fator de risco para diferentes patologias bucais, incluindo a cárie (Shimura et al., 1983; Honkala et al., 1992; Suman et al., 2008).

Essa resposta está intimamente ligada à ativação do sistema nervoso simpático que resulta em liberação de neurotransmissores como a noradrenalina (ou norepinefrina) (Ostamn-Smith 1979; Natelson et al., 1988; Schommer et al., 2003) bem como a ativação do sistema hipotálamo-hipófise-supra-renal, que, por sua vez, resulta na liberação de adrenalina (ou epinefrina) e de glicorticóides, representado principalmente pelo cortisol (Axelrod & Reisine 1984; Schommer et al., 2003).

Durante o estresse, a liberação de catecolaminas pode aumentar em até dez vezes (Cryer, 1980). É essa reação que torna possível a sobrevivência e a adaptação dos seres vivos aos inúmeros estímulos ambientais, nocivos ou não, a que estão constantemente expostos. Porém, quando esse estímulo é mantido por muito tempo ou é muito intenso, o processo de adaptação pode não ocorrer. Neste

momento, desenvolve-se a fase de exaustão da reação de estresse em que o organismo se torna susceptível a distúrbios e patologias (Selye, 1998).

Tem sido reportado que as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), cuja liberação está aumentada durante respostas ao estresse, tem profundos efeitos no desenvolvimento de doenças infecciosas e no crescimento e expressão de virulência de alguns patógenos. Quanto ao crescimento bacteriano, a noradrenalina e a adrenalina podem induzir o crescimento de microrganismos entéricos como *E. coli* (Lyte & Ernst, 1992; Lyte, 1993) e *Campylobacter jejuni* (Cogan et al., 2007).

Em relação a bactérias presentes na cavidade bucal, Roberts et al. (2002) determinaram (in vitro) os efeitos da adrenalina e noradrenalina no crescimento de 43 microrganismos normalmente encontrados em biofilmes bucais, incluindo *S. mutans*. Os resultados mostraram que as catecolaminas exerceram um efeito indutor de crescimento na maioria das espécies estudadas. Para *S. mutans*, o aumento foi de 13,1% e 16,7% (adrenalina e noradrenalina, respectivamente) quando comparado ao grupo controle.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de catecolaminas (adrenalina e a noradrenalina), as quais representam substâncias liberadas durante o estresse, sobre a adesão de *S. mutans* em braquetes ortodônticos.

4 METODOLOGIA

4.1 PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA

O microrganismo *Streptococcus mutans* (UA159) foi inicialmente reativado a partir da cultura original, cultivado em placas de “Brain Heart Infusion” (BHI) ágar, e incubado a 37°C, em atmosfera de 10% CO₂, por 18-24 horas. As colônias foram suspensas em 5mL de solução de NaCl 0,9% até atingir uma absorbância de aproximadamente 0.135 ($\lambda = 660\text{nm}$), o que equivale a $1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (ufc)/mL, seguindo metodologia descrita por (Castro et al., 2009).

4.2 DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E PREPARO DAS SOLUÇÕES TESTES

Braquetes (Roth Morelli[®], Dente 21, Medidas: 0,56mmx0,76mm, Ref. 10.10.200) foram distribuídos em três grupos de tratamento:

- 1- 12 poços contendo noradrenalina (Sigma[®]) a 50 μ M (Roberts et al., 2002);
- 2- 12 poços contendo adrenalina (Sigma[®]) a 100 μ M (Roberts et al., 2002);
- 3- 12 poços contendo NaCl 0,9% (grupo controle).

Todas as soluções foram filtradas através de membrana filtrante 0,2 μ m GV Millex estéril (Millipore-Bedford[®], MA, USA) (Figura 1).



Figura 1 – Preparo das soluções. Todas as soluções foram previamente filtradas (membrana filtrante 0,2 μ m GV Millex estéril - Millipore-Bedford[®], MA, USA)

4.3 TESTE DE ADESÃO

Para avaliar a adesão de *S. mutans* em braquetes, foram usadas células de *S. mutans* (UA159) em microtécnica modificada por Castro et al. (2009), utilizando microplacas com 96 poços com fundo cônico.

O BHI foi inoculado com suspensão bacteriana, conforme descrito no item 4.1, na proporção 1:1000, de modo a obter uma concentração bacteriana de 1×10^5 ufc/mL e em seguida, foi acrescido de 1% de sacarose (w/v).

Em cada poço da placa contendo os braquetes (inseridos sempre na mesma posição), foram dispensados 195 μ L do meio (BHI + Sacarose), e em seguida 5 μ L das soluções-testes (Figura 2).

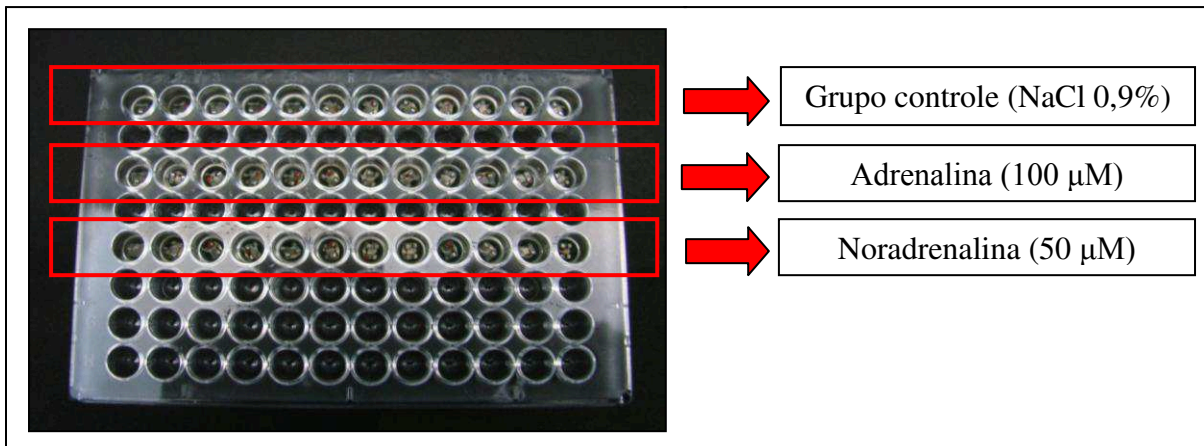


Figura 2 – Microplaca (96 poços) contendo os braquetes e as soluções testes/controlê utilizada para o teste de adesão de *S. mutans* em braquetes ortodônticos

Após incubação por 24 horas (37°C, em atmosfera de 10% CO₂), os braquetes foram lavados três vezes em solução estéril de NaCl 0,9%, objetivando-se a remoção do meio de cultura e de células não aderidas. Em seguida, os braquetes foram colocados individualmente em tubos tipo Falcon contendo 4mL de NaCl 0,9%. Para o total desprendimento do biofilme aderido, foi utilizada a sonicação pelo aparelho Vibra Cell[®] (Sonics & Material Inc), durante um período de três minutos (Figura 3).

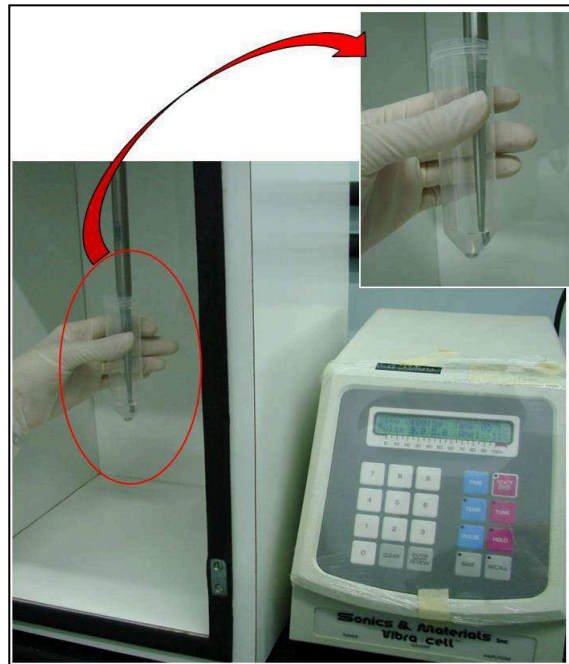


Figura 3 – Sonicação Vibra Cell® (Sonics & Material Inc) para o desprendimento dos microrganismos aderidos nos braquetes ortodônticos

Da suspensão resultante, 100µL foi transferida para tubos do tipo “ependorf” contendo 0,9mL de NaCl 0.9%, passando por diluições seriadas (10^1 até 10^3). De cada diluição, foi removida uma alíquota de 10µL, a qual foi plaqueada em BHI Ágar (Figura 4).

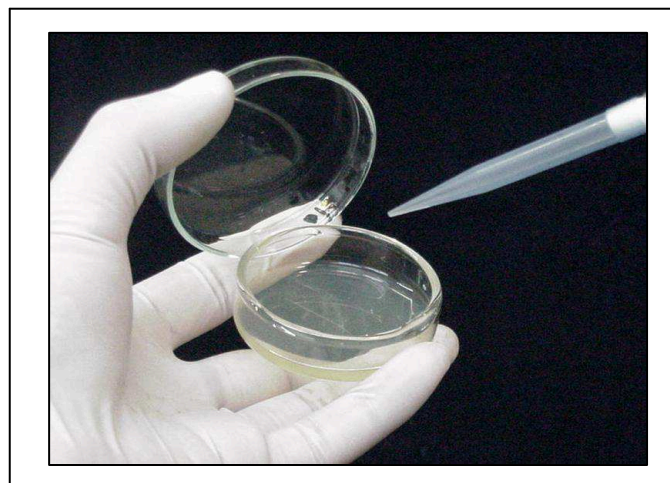


Figura 4 – Etapa de plaqueamento das diferentes diluições utilizadas (10^1 até 10^3) para cada solução teste/control

As placas foram incubadas em estufa com 10% CO₂ (37°C) por 48h. Após o período de incubação, foi realizada a contagem de ufc/mL da diluição mais adequada.

Todos os procedimentos do presente estudo foram realizados em duplicata e em dois experimentos distintos.

5 RESULTADOS

Em decorrência da característica não paramétrica da amostra, os resultados obtidos em ufc/mL foram inicialmente convertidos em \log_{10} para a interpretação dos resultados. Após este procedimento, e conferência da característica paramétrica do resultado, os dados obtidos desta conversão (\log_{10}) foram tratados com teste estatístico de ANOVA (um critério, bicaudal), complementado por *t-student*. O nível de significância adotado para este estudo foi de 5% ($p < 0,05$).

Ambas as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) testadas no presente estudo aumentaram significativamente ($p < 0,001$) a adesão de *S. mutans* no braquetes ortodônticos em relação ao grupo controle (NaCl 0,9%). Os resultados obtidos podem ser observados na figura 5.

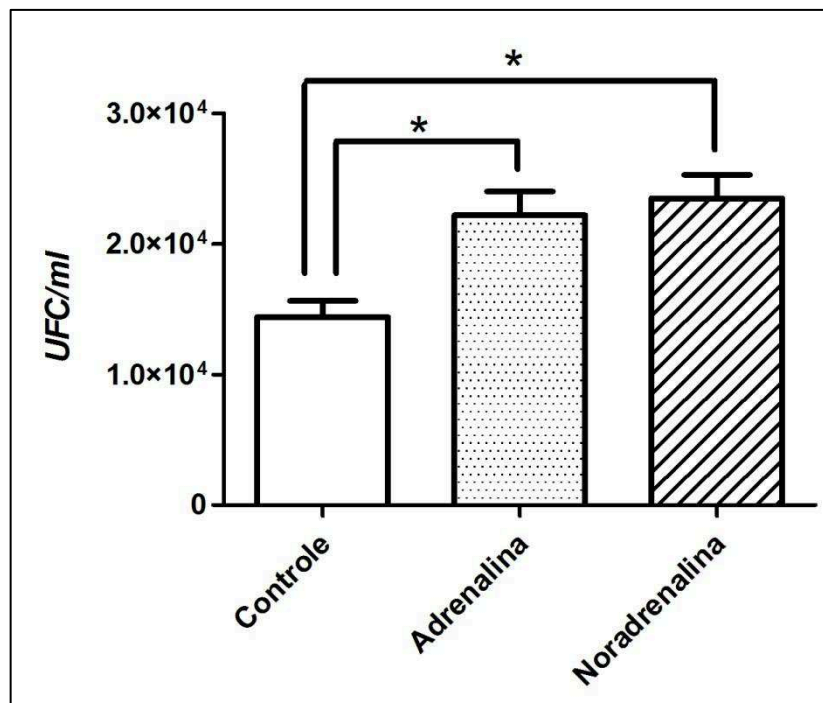


Figura 5 – Unidade formadora de colônia (UFC)/mL de *S. mutans* aderido em braquetes ortodônticos (Média ± EPM)

*Indica diferença estatística (ANOVA, *t-student* – $p < 0,001$).

6 DISCUSSÃO

No conhecimento dos autores, este é o primeiro trabalho a avaliar o efeito da adrenalina e da noradrenalina sobre a adesão de *S. Mutans* sem braquetes ortodônticos.

O estresse, patologia em ascensão nos dias atuais, caracteriza-se por uma série de respostas adaptativas com a finalidade de tentar manter a homeostase interna. Dentre as principais alterações observadas durante o estresse, é relatado um aumento da atividade nos seguintes sistemas: (1) Eixo Hipotálamico-Hipófisario-Adrenal (HHA) - o qual resulta em uma maior liberação de cortisol através do córtex adrenal; (2) Simpático-Adrenal medular (SAM) – o qual resulta em uma maior secreção de adrenalina e de noradrenalina (catecolaminas) através das terminações nervosas simpáticas e da medula adrenal (Schommer et al., 2003).

Esta patologia é reconhecida por representar um importante fator de risco para o desenvolvimento de diferentes doenças da cavidade bucal, dentre elas a doença periodontal e a cárie (Borysenko et al., 1980; Honkala et al., 1992; Peruzzo et al., 2007; Suman et al., 2008). Atualmente, os principais mecanismos biológicos atribuídos para que o estresse se constitua um fator de risco para as doenças orais são: (1) imunodepressão, em decorrência dos altos níveis de cortisol, a qual prejudicaria a resposta do hospedeiro frente a uma infecção; (2) alteração no padrão comportamental, a qual refletiria em um déficit na higiene bucal (Rosania et al., 2009).

Os achados do presente estudo demonstraram que as catecolaminas podem atuar (in vitro) diretamente sobre *S. mutans* alterando seu perfil de virulência. Nossos achados indicaram que tanto a adrenalina como a noradrenalina

aumentaram significativamente a adesão deste microrganismo em uma superfície sólida, que em nosso estudo, foi representado pelo braquete ortodôntico (outro fator de risco para o desenvolvimento de doenças bucais, principalmente a cárie).

A escolha da concentração de cada substância utilizada (adrenalina: 100 μ M e noradrenalina: 50 μ M) foi baseada em estudos prévios publicados por Roberts et al. (2002-2005). Nestes trabalhos, os autores encontraram que estas catecolaminas foram capazes de alterar o padrão de crescimento de diferentes bactérias orais (43 microrganismos avaliados), dentre elas o *S. mutans*, o qual apresentou um aumento na taxa de crescimento quando da presença destas catecolaminas (aumento de 13,1% com a adição de adrenalina e 16,7% com a adição de noradrenalina).

Em acréscimo ao aumento na taxa de crescimento bacteriano, outros estudos também atribuem a estas catecolaminas propriedades de modificar o perfil de virulência de certos microrganismos.

Em um estudo realizado por Lyte et al. (1997), a suplementação do meio de cultura com noradrenalina, além de induzir um maior crescimento de *Escherichia coli*, promoveu um aumento na produção de uma importante da proteína de adesão celular e da capacidade invasiva (Fímbria K99) deste microrganismo.

Ainda sobre este aspecto, Walters & Sperandio (2006) após uma avaliação in vitro do efeito da adrenalina sobre *E. coli* demonstraram que esta substância pode contribuir para uma ativação do locus de intumescimento no enterócito – LEE (*Locus of enterocyte effacement*). O LEE, o qual é composto por 41 genes organizados em cinco operons policistrônico, é responsável também por propriedades de adesão e invasão celular, portanto, os autores concluem que catecolaminas poderiam contribuir para um maior perfil de virulência deste microrganismo.

Embora os mecanismos exatos do efeito das catecolaminas sobre microrganismos (atuação no crescimento/virulência) não estejam completamente esclarecidos, Kinney et al. (2000) relatam que esta ação parece não ser mediada pela atuação em receptores adrenérgicos, uma vez que os resultados não são alterados com a adição de bloqueadores adrenérgicos farmacológicos, e sim, por uma atuação nos seguintes mecanismos: (1) indução da produção de substâncias autoindutores de crescimento bacteriano/fatores de virulência; (2) atuação destas catecolaminas como um composto sideróforo, promovendo assim a captação de ferro pelos microrganismos (Freestone et al., 1999-2000; Kinney et al., 2000).

A escolha do braquete ortodôntico como a “superfície” sólida para o crescimento bacteriano no presente estudo se deve a principalmente a dois fatores. O primeiro, ao crescente número de usuários da aparatologia ortodôntica na busca de uma correção funcional da arcada dentária, bem como um sorriso harmônico. O segundo, ao braquete ortodôntico representar um fator de risco para o desenvolvimento da cárie. Isto se deve principalmente a sua estrutura retentiva, a qual propicia o acúmulo de placa bacteriana, funcionando assim, como um importante reservatório microbiano (Brusca et al., 2007; Papaioannou et al., 2007).

Desta forma, ao utilizar o braquete ortodôntico, buscou-se associar estes dois fatores de riscos (uso do braquete ortodôntico e estresse) em relação à cárie dental. Neste sentido, mesmo considerando as limitações do estudo (in vitro) parece-nos plausível a hipótese de que hormônios liberados durante o estresse podem ser reconhecidos por microrganismos, promovendo assim, uma modificação em seu perfil de virulência. Assim, em usuários da aparatologia ortodôntica, o dentista deve sempre considerar a realização de orientações adicionais relacionados

a higiene dental, e estas deverão ser redobradas caso o paciente possua a sintomatologia de estresse.

Novamente, este trabalho representa um passo inicial para um melhor entendimento de como a adrenalina e a noradrenalina podem contribuir para o desenvolvimento de doenças bucais, mais especificamente a cárie. Estudos adicionais (in vitro / in vivo) buscando alvos biológicos específicos se fazem necessários para a exata compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos neste processo.

7 CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo sugerem que a adrenalina e a noradrenalina podem contribuir para um aumento na adesão de *S. mutans* à braquetes ortodônticos, podendo assim, potencializar o risco para o desenvolvimento da doença cárie em pacientes usuários da aparatologia ortodôntica.

REFERÊNCIAS¹

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-1322.
2. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994; 8: 263-271.
3. Faltermeier A, Bürgers B, Martin R. Bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* to esthetic bracket materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008; 133: S99-103.
4. Peterson K, Chao CC, Molitor T, Murtaugh M, Strgar F, Sharp BM. Stress and pathogenesis of infectious diseases. *Rev Infectious Dis* 1991; 13: 710–720.
5. Lyte M, Erickson AK, Arulanandam BP, Frank CD, Crawford MA, Francis DH. Norepinephrine-induced expression of the K99 pilus adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Biochem Biophys. Res Commun* 1997; 232: 682–686.
6. Freestone PP, Lyte M, Neal CP, Maggs AF, Haigh RD, Williams PH. The mammalian neuroendocrine hormone norepinephrine supplies iron for bacterial growth in the presence of transferrin or lactoferrin. *J Bacteriol* 2000; 182: 6091–6098.
7. Roberts A, Matthews JB, Socransky SS, Freestone PPE, Williams PH, Chapple ILC. Stress and the periodontal diseases: growth responses of periodontal bacteria to *Escherichia coli* stress-associated autoinducer and exogenous Fe. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 147–153.
8. Jenkinson F, Lappin-Scott HM. Biofilms adhere to stay. In: 147^o Ordinary Meeting of the General Microbiology; 2000 Sept. 12-15; Exeter – UK: University of Exeter, 2000.
9. Nishihara T, Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontology* 2000 2004; 36: 14–26.
10. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5721-5732.

¹ Referências elaboradas segundo o modelo Vancouver

11. Bowen WH. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 126-131.
12. Yazaki SC, Koga-it CY, Jorge AOC, Unterkircher CS. IgA anti-Streptococcus mutans em crianças com e sem cárie dentária. *Revista Odontológica da Universidade de São Paulo* 1999; 13: 211-217.
13. Petti S, Hausen HW. Caries prediction by multiple salivary mutans streptococcal counts in caries-free children with different levels of fluoride exposure, oral hygiene and sucrose intake. *Caries Res* 2000; 34: 380-387.
14. Fejerskov O, Nyvad B, Kidd EAM. Pathology of dental caries. In: Fejerskov O, Kidds EAM, editors. *Dental caries. The Disease and its clinical management*. 2a ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008 p.19-48.
15. Grönroos L. Quantitative and qualitative characterization of mutans Streptococci in saliva and in the dentition [Dissertação de mestrado] Helsinki. Department of Periodontics and Orthodontics, Institute of Dentistry, University of Helsinki and Department of Oral and Maxillofacial Diseases, Helsinki University Central Hospital, 2000. 80f.
16. Koneman E, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr. *Diagnóstico microbiológico*. 5a ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001. p.1465
17. Carlsson P, Olsson B, Bratthall D. The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique. *Arch Oral Biol* 1985; 30: 265-268.
18. Castro A, Mochidome FI. *Streptococcus mutans* na cavidade bucal de bebês e sua relação com a cárie dentária. *Revista do CRO-MG* 2000; 6: 24-27.
19. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986; 50: 353-380.
20. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 1980; 44: 331-384.

21. Gibbons RJ. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *J Dent Res* 1994; 63: 378-385.
22. Fozo EM, Quivey RG Jr. The *fabM* gene product of *Streptococcus mutans* is responsible for the synthesis of monounsaturated fatty acids and is necessary for survival at low pH. *J Bacteriol* 2004; 185: 4152-4158.
23. Kobayashi H. A proto-translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm. *J Biol Chem* 1985; 260: 72-76.
24. Bender GR, Sutton SV, Marquis RE. Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infect Immun* 1986; 53: 331-338.
25. Quivey RG Jr, Kuhnert WL, Hahn K. Adaptation of oral streptococci to low pH. *Adv Microbiol Physiol* 2000; 42: 239-274.
26. Kuhnert WL, Zheng G, Faustoferri RC, Quivey RG Jr. The F-ATPase operon promoter of *Streptococcus mutans* is transcriptionally regulated in response to external pH. *J Bacteriol* 2004; 186: 8524-8528.
27. Hanada N, Karamitsu HK. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* *gtfD* gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. *Infect Immun* 1989; 57: 2079-2085.
28. Matsumura M, Izumi T, Tsuji M, Fujiwara T, Ooshima T. The role of glucan-binding proteins in the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 213-215.
29. Rosenbloom RG, Tinanoff N. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients before, during, and after orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1991; 100: 35-37.
30. Ahn SJ, Lim BS, Yang HC, Chang YI. Quantitative analysis of the adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic metal brackets. *Angle Orthod* 2005; 75: 666-671.
31. Gorelick L, Geiger AM, Gwinnett AJ. Incidence of white spot formation after bonding and banding. *Am J Orthod* 1982; 81: 93-98.

32. Brusca MI, Charab O, Sterin-Bordac LA, Rosad C. Influence of different Orthodontic brackets on adherence of microorganisms in vitro. *Angle Orthodontist* 2007; 77: 331-336.
33. Papaioannou W, Gizanib S, Nassikac M, Efterpi Kontoud E, Nakoue M. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different types of brackets. *Angle Orthodontist* 2007; 77: 1090-1095.
34. Mitchell L. Descalcification during orthodontic treatment with fixed appliances an overview. *Br J Orthod* 1992; 19: 199-205.
35. Eliades T, Eliades G, Brantley WA. Microbial attachment on orthodontic appliances: I. Wettability and early pellicle formation on bracket materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1995; 99: 351–375.
36. Ahn SJ, Kho HS, Lee SW, Nahm DS. Roles of salivary proteins in the adherence of oral streptococci to various orthodontic brackets. *J Dent Res* 2002; 81: 411-415.
37. Shimura N, Nakamura C, Hirayama Y, Yonemitsu M. Anxiety and dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 1983; 11: 224-227.
38. Honkala E, Maida D, Kolmakow S. Dental caries and stress among South African political refugees. *Quintessence Int* 1992; 23: 579-583.
39. Suman M, Spalj S, Plancak D, Dukic W, Juric H. The influence of war on the oral health of professional soldiers. *Int Dent J* 2008; 58: 71-74
40. Ostman-Smith I. Adaptive changes in the sympathetic nervous system and some effector organs of the rat following long term exercise or cold acclimation and the role of cardiac sympathetic nerves in the genesis of compensatory cardiac hypertrophy. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1979; 447: 1-118.
41. Natelson BH, Ottenweller JE, Cook JA, Pitman D, McCart R, Tap WN. Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. *Physiol Behav* 1988; 43: 41-46.
42. Shommer NC, Hellhammer DH, Kirachbaum C. Dissociation between reactivity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and sympathetic-adrenal medullary system to repeated psychosocial stresses. *Psychosom Med* 2003; 65: 450-460.

43. Axelrod J, Resine TD. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 1984; 224: 452-459.
44. Cryer PE. Physiology and pathophysiology of the human sympathoadrenal neuroendocrine system. *N Engl J Med* 1980; 303: 436-444.
45. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1998; 10: 230-231.
46. Lyte M, Ernest S. Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sci* 1992; 50: 203-212.
47. Lyte M. The role of microbial endocrinology in infectious disease. *J Endocrinol* 1993; 137: 343-345.
48. Cogan TA, Thomas AO, Rees LE, Taylor AH, Jepson MA, Williams Ph, et al. Norepinephrine increases the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni*. *Gut* 2007; 56: 1060-1065.
49. Roberts A, Matthews JB, Socransky SS, Freestone PP, Williams PH, Chapple IL. Stress and the periodontal diseases: effects of catecholamines on the growth of periodontal bacteria in vitro. *Oral Microbiol Immunol*. 2002; 17: 296-303.
50. Castro ML, Nascimento AM, Ikegaki M, Costa-Neto CM, Alencar SM, Rosalen PL. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. *Bioorg Med Chem* 2009 Jul 15; 17(14): 5332-5335.
51. Borysenko M, Turesky S, Borysenko JZ, Quimby F, Benson H. Stress and dental caries in the rat. *J Behav Med* 1980; 3: 233-243.
52. Honkala E, Maida D, Kolmakow S. Dental caries and stress among South African political refugees. *Quintessence Int* 1992; 23: 579-583.
53. Peruzzo DC, Benatti BB, Ambrosano GM, Nogueira-Filho GR, Sallum EA, Casati MZ, et al. A systematic review of stress and psychological factors as possible risk factors for periodontal disease. *J Periodontol* 2007; 78: 1491-1504.

54. Suman M, Spalj S, Plancak D, Dukic W, Juric H. The influence of war on the oral health of professional soldiers. *Int Dent J* 2008; 58: 71-74.
55. Rosania AE, Low KG, McCormick CM, Rosania DA. Stress, depression, cortisol, and periodontal disease. *J Periodontol* 2009; 80: 260-266.
56. Walters M, Sperandio V. Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2006; 74: 5445-5455.
57. Kinney KS, Austin CE, Morton DS, Sonnenfeld G. Norepinephrine as a growth stimulating factor in bacteria--mechanistic studies. *Life Sci* 2000; 67: 3075-3085.
58. Freestone PP, Haigh RD, Williams PH, Lyte M. Stimulation of bacterial growth by heat-stable, norepinephrine-induced autoinducers. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 172: 53-60.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desta obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Antonio Cardoso de Andrade
Taubaté – SP. Setembro de 2010

