UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Puericultura e Pediatria

MARIANA CASTRO LOUREIRO BORGES E CURI

Caracterização da resposta imune de mucosas a colonizadores iniciais da cavidade bucal em recém-nascidos a termo e pré-termo: um estudo prospectivo

Ribeirão Preto

2015

MARIANA CASTRO LOUREIRO BORGES E CURI

Caracterização da resposta imune de mucosas a colonizadores iniciais da cavidade bucal em recém-nascidos a termo e pré-termo: um estudo prospectivo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção de título de Doutor

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Opção: Investigação em Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Paes Leme Ferriani.

Ribeirão Preto

2015

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Departamento Técnico do Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade de São Paulo

Borges, Mariana Castro Loureiro

Caracterização da resposta imune de mucosas a colonizadores iniciais da cavidade bucal em recém-nascidos a termo e pré-termo: um estudo prospectivo. Ribeirão Preto, 2015.

86 p

Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente Opção: Investigação em Pediatria

Orientadora: Ferriani, Virgínia Paes Leme

1.*Streptococcus mutans*. 2.IgA. 3.IgM. 4.Saliva. 5.Prematuridade

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BORGES, Mariana Castro Loureiro

Título: Caracterização da resposta imune de mucosas a colonizadores iniciais da cavidade bucal em recém-nascidos a termo e pré-termo: um estudo prospectivo.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor
Área de concentração: Saúde da Criança e do adolescente
Opção: Investigação em Pediatria

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, Marcio e Luciana, que por uma vida de dedicação, amor e trabalho sempre possibilitaram a seus filhos a oportunidade de realizar sonhos e conquistas.
Ao meu irmão Antonio pela amizade e carinho.
À minha querida avó Cidinha, que através de seu amor incondicional, iluminou o caminho da minha vida.
Aos meus filhos João Luis e Maria e meu esposo Marco Antonio, pela importância em minha vida e sem os quais nenhuma conquista valeria a pena.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Virgínia Paes Leme Ferriani, pelo carinho, apoio e participação constante em minha formação profissional e pelo incentivo a meu projeto.

À Profa. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins, pela amizade, ensinamentos e principalmente pela oportunidade de fazer parte deste trabalho.

À minha família, pela compreensão e substituição de minha presença de forma amável e colaborativa no período de minha dedicação a este estudo.

À minha querida Lida, simplesmente por existir.

À minha amiga Maria Lúcia Talarico Sesso pela companhia e apoio em todos os momentos de dificuldades.

À minha amiga Juliana Cristina da Silva Castanheira pela afinidade, momentos compartilhados e objetivos em comum.

À Luciana Rodrigues Roberti, biomédica do Laboratório de Imunologia Pediátrica, pela colaboração em várias fases do trabalho.

À Prof. Dra. Marisa Márcia Mussi Pinhata e Dra. Luisa Karla Arruda pelas valiosas sugestões no trabalho.

Ao Davi Casale Aragon, pelo auxílio importantíssimo na análise dos dados.

Aos amigos da equipe de Pediatria da Universidade de Uberaba pela torcida.

Às secretárias do Departamento de Puericultura e Pediatria da HCFMRP, pela atenção oferecida.

Aos professores da banca examinadora, que prontamente aceitaram participar desta nova etapa da minha carreira.

A todos os funcionários e enfermeiras do Alojamento conjunto do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pela presteza e apoio durante a coleta e entrevista com as mães participantes ao estudo.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo incentivo financeiro através da concessão da bolsa de Doutorado.

A todas as mães participantes do projeto, sem as quais os resultados obtidos não seriam possíveis.

RESUMO

BORGES, M. C. L. **Caracterização da resposta imune de mucosas a colonizadores iniciais da cavidade bucal em recém-nascidos a termo e pré-termo: um estudo prospectivo.** 2015. 86p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Imunoglobulinas secretoras presentes nas superfícies mucosas representam a primeira linha de defesa do sistema imune adaptativo contra desafios infecciosos. A imunidade humoral de recém-nascidos prematuros é diminuída em comparação a recém-nascidos a termo. A identificação de antígenos de virulência de bactérias colonizadoras da cavidade oral pode ajudar na investigação dos mecanismos de estimulação antigênica e desenvolvimento da resposta imune de mucosa. No presente estudo, foram medidos os níveis de imunoglobulina A (IgA) e M (IgM) na saliva e caracterizada a especificidade de IgA contra antígenos de espécies de estreptococos da cavidade oral no início da vida. Foram estudadas as respostas de anticorpos IgA específicos para espécies bacterianas pioneiras (*Streptococcus mitis , S. sanguinis , S. gordonii*) e patogênicas (*Streptococcus mutans*) da cavidade oral em crianças a termo (AT) e pré-termo (PT) em duas visitas: ao nascimento (T0) e aos 3 meses de idade (T3). Salivas de 123 crianças (72 AT e 51 PT) foram coletadas durante as primeiras 10h após o nascimento (T0) e, novamente, aos 3 meses de idade (T3). Os níveis de anticorpos IgA e IgM nas amostras salivares foram analisados por ELISA. Um subgrupo de 26 crianças AT e 24 PT foram comparados com relação a padrões de especificidades de anticorpos contra diferentes antígenos de estreptococos, utilizando ensaios de *Western blot*. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos níveis salivares de IgA e IgM entre o grupo de crianças AT e PT ao nascimento. Em T3, os valores médios de IgA foram semelhantes entre os grupos e os níveis de IgM foram significativamente maiores em PT que AT ($p < 0,05$). Os ensaios *Western blot* identificaram resposta positiva de IgA para os estreptococos estudados na maioria das crianças, especialmente no grupo AT . Houve algumas diferenças entre os grupos com relação à frequência de crianças com resposta positiva a antígenos e intensidade da resposta IgA. Em geral, os antígenos de estreptococos orais foram mais frequentemente detectados e as bandas foram mais intensas no grupo de crianças AT quando comparados aos PT, especialmente em T3. Análise prospectiva de padrões de IgA específica para os antígenos de diferentes espécies de estreptococos revelou um aumento na complexidade da resposta de anticorpos IgA do nascimento (T0) até os 3 meses de vida (T3), tanto em PT quanto nos AT. O padrão de

resposta de IgA aos antígenos dos estreptococos parece ser influenciado pela idade gestacional, o que pode refletir o grau de maturidade do sistema imune de mucosa.
Palavras-chave: *Streptococcus mutans*,, IgA, IgM, saliva, prematuridade

ABSTRACT

BORGES, M. C. L. **Salivary antibody response to streptococci in preterm and fullterm children: a prospective study.** Thesis (Doctoral). School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil. 2015

Secretory immunoglobulins present in mucosa surfaces represent the first line of defense of the adaptive immune system against infectious challenges. Preterm neonates humoral immunity is diminished compared to fullterm newborns. The identification of important antigens of virulence of oral species may help in the investigation of the mechanisms of antigenic stimulation and the development of the mucosal immune response. In the present study we measured saliva levels of immunoglobulin A (IgA) and M (IgM) and characterized the specificity of IgA against antigens of several streptococcal species found early in life. Salivary IgA antibody responses to bacterial species that are prototypes of pioneer (*Streptococcus mitis, S. sanguinis, S. gordonii)* and pathogenic (*Streptococcus mutans)* microorganisms of the oral cavity were studied in fullterm (FT) and preterm (PT) children in two visits: at birth (T0) and at 3 months of age (T3). Salivas from 123 infants (72 FT and 51 PT) were collected during the first 10h after birth (T0) and again at 3 months of age (T3). Salivary levels of IgA and IgM antibodies were analyzed by ELISA. A subgroup of 26 FT and 24 PT children were compared with respect to patterns of antibody specificities against different streptococci antigens using Western blot assays. No significant differences ($P>0.05$) in salivary levels of IgA and IgM between FT and PT babies were found at birth. At T3, mean sIgA values were similar between groups and salivary IgM levels were significantly higher in PT than FT ($p<0.05$). Western blot assays identified positive IgA response to streptococci in the majority of children, especially in the FT group. There were some differences between groups in relation to the frequency of children with positive response to antigens and intensity of IgA response. In general, oral streptococci antigens were more frequently detected and bands were more intense in FT than in PT, especially in T3. Prospective analysis of patterns of saliva IgA against Ags of different streptococcal species revealed an increase in complexity of the salivary IgA antibody response from the first day of birth (T0) to T3 in PT and FT. The patterns of salivary IgA response to streptococci antigens appear to be influenced by the gestational age, which might reflect the level of immunological maturity of the mucosal immune system. *KEYWORDS: Streptococcus mutans*, IgA, IgM, saliva, prematurity

LISTA DE SIGLAS

Ag	Antígeno
AT	A termo
GbpB	Glucan binding protein B
Gtf	Glicosiltransferase
IgA	Imunoglobulina A
IgAs	IgA Secretora
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Kda	kilodalton
PT	Pré- termo
SGO	*Streptococcus gordonii*
SMI	*Streptococcus mitis*
SMi	*Streptococcus mitis* biovar 1
SM	*Streptococcus mutans*
SSA	*Streptococcus salivarius*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
2. REVISÃO DE LITERATURA 14
2.1. Diversidade de estreptococos colonizadores da cavidade bucal no início da vida 14
2.1.1. Antígenos de virulência de estreptococos orais 15
2.2. Resposta imune de mucosas contra a invasão microbiana oral no início da vida 15
2.2.1. Resposta imune de IgA específica a microrganismos orais 19
2.3. Desenvolvimento do sistema imunológico em neonatos a termo e prematuros 20
3. OBJETIVOS 23
4. MATERIAL E MÉTODOS 24
4.1. Delineamento de estudo 24
4.2. Coleta de saliva 25
4.3. Análise dos níveis salivares de imunoglobulinas: IgA e IgM - ELISA 25
4.4. Análise das concentrações de proteínas das amostras salivares 27
4.5. Ensaios para análise da complexidade de resposta de IgA contra antígenos de SM, SMI, SSA e SGO. 27
4.5.1. Preparação de antígenos bacterianos. 27
4.5.2 Análise da complexidade da resposta de IgA salivar contra antígenos bacterianos em ensaios de Western blot. 28
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA 30
6. RESULTADOS 31
6.1. População do estudo. 31
6.2. Níveis de IgA, IgM e proteínas nas amostras salivares ao nascimento e aos 3 meses de vida 31
6.3. Detecção de IgA específica aos antígenos bacterianos nas amostras salivares. 36
6.4. Intensidade da resposta específica de IgA aos antígenos bacterianos nas amostras salivares. 39
7. DISCUSSÃO 42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 47
ANEXOS 59

1. INTRODUÇÃO

O sistema imune de mucosa representa a primeira linha de defesa da resposta imune adaptativa contra desafios infecciosos. A atividade antibacteriana nas secreções é mediada, em parte, pela IgA secretora (IgAs) presente na saliva e outros fluidos corporais (MCGHEE *et al*., 1992, RUSSELL *et al*., 1999, MICHETTI *et al*., 1992). Esta imunoglobulina é capaz de controlar a microbiota oral através da redução da aderência de bactérias na mucosa oral e na superfície dentária.

A concentração de IgA na saliva é considerada, por alguns autores, como indicador do desenvolvimento do sistema imune de mucosas em crianças (SEIDEL *et al*., 2000, WAN *et al*., 2003), e já foi observada associação entre redução transitória dos níveis de IgA detectados na saliva e aumento da susceptibilidade às infecções do trato gastrointestinal (SEIDEL *et al*., 2000, WAN *et al*., 2003), reforçando a importância da maturação do sistema imune de mucosas no combate às infecções.

A cavidade oral é a principal entrada de inúmeros micro-organismos, entre eles, o *Streptococcus salivarius* (SSA) e *Streptococcus mitis* (SMI) que são os principais colonizadores precoces da cavidade oral. Após a erupção dos dentes, novas espécies são encontradas na boca, tais como *Streptococcus mutans* (SM). No entanto, em algumas populações altamente expostas à sacarose, estes micro-organismos já são detectados antes da erupção dos dentes decíduos. *Streptococcus mutans* é considerado o principal patógeno associado à cárie dentária, devido à sua capacidade de aderir e se acumular na superfície dentária, em presença de sacarose, formando o biofilme dental que gera a produção de altas concentrações de ácidos, os quais promovem a desmineralização dos tecidos dentários (LOESCHE *et al*., 1993). Por outro lado, algumas das espécies pioneiras, como *Streptococcus mitis* (SMI), *Streptococcus gordonii* (SGO) *e Streptococcus sanguinis* (SSA) podem estar associadas a endocardite bacteriana (VACCA-SMITH *et al*., 1994).

Estes micro-organismos, comumente encontrados na cavidade bucal, no início da vida, exibem diversos antígenos de virulência que determinam sua capacidade de colonização e manutenção na cavidade bucal. A identificação destes antígenos de virulência pode contribuir para a investigação dos mecanismos de estímulação antigênica e do desenvolvimento da resposta imune de mucosa.

Alguns antígenos importantes de virulência destas espécies foram previamente descritos, tais como: 153 Kilodalton (kDa) de SGO e 170 kDa de SSA que são glicosiltransferases (Gtfs). VACCA – SMITH *et al*., 2000 e POULSEN *et al*., 1998

sequenciaram uma IgA1-protease de *Streptococcus mitis* com 200kDa. SM possuem vários antígenos de virulência, sendo os principais: uma adesina (Ag I/II) de 185 kDa, a glicosiltransferase de 160kDa, e uma proteína de ligação à glucano B (GbpB) com 56 kDa (DEMUTH *et al*., 1988; HANADA & KURAMITSU *et al*., 1988; MATTOS-GRANER *et al*., 2001) .

Poucos estudos caracterizaram a ontogenia do sistema imune de mucosas em crianças recém-nascidas e durante os primeiros anos de vida, especialmente a resposta imune adaptativa contra estas espécies e seus antígenos de virulência. Estudo prospectivo realizado com crianças brasileiras entre 5 e 24 meses de idade, mostrou uma alta complexidade de resposta de anticorpos IgA salivares contra antígenos bacterianas de SM e SMI (NOGUEIRA *et al.*, 2005; NOGUEIRA *et al*., 2007). Esses resultados sugerem que as respostas positivas a estes antígenos de virulência poderiam modular a capacidade de colonização do SM, visto que crianças não colonizadas apresentavam altos níveis de anticorpos específicos. Além disso, estudo realizado pelo nosso grupo mostrou altos níveis de IgA específicos para antígenos de SM e SMI em amostras de saliva de neonatos. Nesse mesmo estudo, crianças prematuras apresentaram níveis inferiores, quando comparadas a crianças nascidas a termo (NOGUEIRA *et al*., 2012).

Reconhecidamente, os recém-nascidos têm uma maior incidência de colonização por vários micro-organismos quando comparados com adultos ou crianças mais velhas, devido à imaturidade do sistema imunológico (CLAPP *et al*., 2006; KAUR *et al*., 2007). Vários fatores podem influenciar o desenvolvimento eficaz de uma resposta imune de mucosa, incluindo o estado nutricional, aleitamento materno, exposição a antígenos, fatores genéticos e idade gestacional (MARUYAMA *et al*., 2009), o que justifica que bebês nascidos prematuramente tenham susceptibilidade maior às infecções.

Desta maneira, devido à escassa informação sobre a resposta imune durante os primeiros estágios de desafio bacteriano, o presente estudo analisou prospectivamente os níveis de IgA e Imunoglobulina M (IgM) na saliva e especificidade de IgA contra antígenos de espécies de estreptococos colonizadoras iniciais da cavidade bucal, ao nascimento e após 3 meses de idade, em recém-nascidos a termo (AT) e prematuros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Diversidade de estreptococos colonizadores da cavidade bucal no início da vida

Logo após o nascimento, a criança entra em contato com diversos micro-organismos presentes no ambiente em que vive, principalmente através da mãe e outras pessoas com quem mantém contato. Alguns dos micro-organismos são transitórios, outros se tornam residentes, como por exemplo, os estreptococos que representam a maioria das bactérias que colonizam primeiramente a cavidade bucal.

Com um mês de vida, espécies como *Streptococcus mitis* foram identificadas, por meio de cultura, em crianças saudáveis (PEARCE *et al*., 1995), sendo essa a espécie de estreptococo oral mais frequentemente detectada em crianças de 1 a 5 meses de idade (SMITH, TAUBMAN *et al*., 1990). Assim que os dentes começam a erupcionar na cavidade bucal, surgem novos sítios de colonização e a microbiota oral torna-se progressivamente mais complexa. A presença de superfícies dentais não descamativas é suficiente para a colonização por outras espécies de estreptococos orais, *Streptococcus gordonii* (TAPPUNI, CHALLACOMBE *et al*., 1993) e *Streptococcus sanguinis* (CARLSSON *et al*., 1975). A colonização inicial de *SSA* ocorre durante uma "janela de infectividade", por volta dos 9 meses de idade, estando relacionada significativamente com a erupção do primeiro dente, que ocorre em uma idade mediana de 7,1 meses (CAUFIELD *et al*., 2000).

Posteriormente, o período de 19 a 31 meses de idade é definido como a "janela da infectividade de *SM*" (CAUFIELD *et al*., 1993; SMITH *et al*., 1998). A aquisição inicial de SM pode ocorrer antes deste período de janela de infecção (19-31 meses), especialmente em crianças brasileiras que são expostas a um elevado consumo de sacarose e ao contato com a saliva de indivíduos altamente infectados (BERKOWITZ *et al*., 1980; KOHLER *et al*., 1994; MATTOS-GRANER *et al*., 2001; TANNER *et al*., 2002; KLEIN *et al*., 2004). As mães parecem ser as principais fontes de infecção por estes microrganismos (LI *et al*., 1995). Diversos outros fatores comportamentais, intrínsecos aos hospedeiros, e ambientais podem influenciar na infecção inicial de SM (TANZER *et al*., 2001), como por exemplo, variações nos hábitos dietéticos, de higiene bucal e deficiências imunológicas. Estudos dos fatores que influenciam a maturação do sistema imunológico de mucosas ainda são escassos (HAJISHENGALLIS *et al*., 1999; MICHALEK *et al*., 2002).

2.1.1. Antígenos de virulência de estreptococos orais

A capacidade de causar infecção microbiana depende de inúmeros antígenos de virulência presentes nas superfícies desses micro-organismos. O reconhecimento destes antígenos e suas propriedades são ferramentas importantes para se entender o processo de colonização da cavidade bucal. Alguns antígenos de virulência de estreptococos pioneiros da cavidade bucal já foram identificados. O antígeno de 153kDa de *Streptococcus gordonii*, que é uma glicosiltransferase (Gtf), é importante no processo de colonização do endocárdio, nos quadros de endocardite bacteriana, por mediar a aderência desta bactéria ao endotélio humano (VACCA-SMITH *et al*., 1994). Além disso, estudos em modelos animais mostraram que essa Gtf é responsável pela capacidade do SGO persistir no biofilme dentário (TANZER *et al*., 2008). VACCA-SMITH e colaboradores (2000) purificaram uma Gtf de *Streptococcus sanguinis* com peso molecular de 170 kDa e POULSEN e colaboradores (1998) sequenciaram uma IgA1-protease de *Streptococcus mitis* com 200kDa.

Três importantes antígenos de SM foram associados à capacidade desse microrganismo aderir e acumular-se no biofilme dentário. Estes antígenos são a adesina (AgI/II) de 185 kDa , a glucosiltransferase de 160kDa que sintetiza glucano a partir de sacarose, e a proteína de ligação à glucano B (GbpB) com 56 kDa (DEMUTH *et al*., 1988; . HANADA & KURAMITSU *et al*., 1988; MATTOS - GRANER *et al*., 2001).

2.2. Resposta imune de mucosas contra a invasão microbiana oral no início da vida

Logo após o nascimento, as crianças são expostas a muitos micro-organismos presentes no ambiente e a indivíduos com quem mantêm contato, principalmente as mães, já que a cavidade oral é a porta de entrada destes micro-organismos. A presença de resposta imunológica eficaz na cavidade bucal representa uma importante ferramenta contra a invasão, colonização e patogenicidade das diferentes espécies microbianas. Portanto, a capacidade do sistema imune responder aos desafios infecciosos durante o estabelecimento da microbiota indígena constitui importante componente de defesa do hospedeiro, já que os níveis bacterianos podem ser controlados pelos anticorpos presentes na saliva. Sendo assim, o entendimento dos componentes imunológicos inatos e adaptativos da cavidade bucal pode fornecer importantes informações a respeito de como a

indução de uma resposta imune direcionada pode ser efetiva contra um contato microbiano inicial.

Reconhecidamente, deficiências do sistema imunológico inato e adaptativo podem aumentar a susceptibilidade a agentes infecciosos (GLEESON *et al*., 1994, SEIDEL *et al*., 2000, WAN *et al*., 2003).

A capacidade de resposta do sistema imune de mucosas a desafios infecciosos durante o estabelecimento da microbiota indígena é importante para a defesa do hospedeiro (MICHALEK *et al*., 2002; LAW *et al*., 2006; MARCOTTE *et al*, 1998) . Os anticorpos produzidos no tecido linfóide mucoso são transportados pelas barreiras epiteliais no lúmen dos órgãos da mucosa. No intestino e nas vias aéreas, por exemplo, os anticorpos estão na superfície luminal do epitélio e inibem a entrada de micro-organismos inalados ou ingeridos (ABBAS, 2008). A IgAS é a principal imunoglobulina nas secreções e tem como função primordial a neutralização de micro-organismos e toxinas através do bloqueio da ligação dessas substâncias a receptores celulares, atuando como primeira linha de defesa adaptativa contra patógenos das mucosas (MCGHEE *et al*., 1992; RUSSELL *et al*., 1999).

A saliva é um importante biofluido da cavidade bucal e desempenha várias funções na manutenção da homeostase da cavidade oral, na proteção dos dentes contra a cárie e também na defesa contra a invasão de micro-organismos. Além da presença de imunoglobulinas, existem outras proteínas com atividade antimicrobiana tais como a lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, aglutininas, mucinas e, as histatinas, que são uma família de peptídeos com atividade inibitória sobre produtos bacterianos, e defensinas e catelicidinas, peptídeos antimicrobianos expressos por células epiteliais de mucosas (VAN NIEUW AMERONGEN *et al*.; 2004).

Dentre as imunoglobulinas encontradas na saliva, as mais frequentes e de maior importância são IgA e IgM. A IgAS é a principal imunoglobulina nas secreções e representa a primeira linha de defesa adaptativa contra patógenos das mucosas (RUSSELL *et al.*, 1999), como por exemplo, contra enterobactérias e vírus em homens e modelos animais (MICHETTI *et al.*, 1992). Estudos em crianças revelaram que praticamente toda a IgA encontrada na saliva total de crianças está na forma dimérica, associada a um componente secretor (SMITH *et al*., 1989).

Os níveis totais de IgA têm sido considerados como indicadores do grau de maturidade desse sistema imune. Crianças recém-nascidas apresentam níveis inferiores de IgA quando comparadas a crianças mais velhas e adultos (FITZSIMMONS *et al*., 1994,

GLEESON *et al*., 1995; BRANDTZAEG *et al*., 1998, SMITH *et al*., 1998, SEIDEL *et al*., 2000, WAN *et al*., 2003).

Além disto, reduções transitórias nos níveis de IgA detectados na saliva foram associadas à maior susceptibilidade a infecções do trato gastrointestinal (GLEESON *et al.*, 1994, SEIDEL *et al*., 2000, WAN *et al*., 2003), reforçando a importância da maturação do sistema imune de mucosas para a proteção contra infecções.

A exposição antigênica ambiental pode influenciar na ontogenia da resposta imune secretora (MELLANDER *et al.*, 1985; NAGAO *et al*., 1993). Maior frequência de infecções respiratórias causadas por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*, observada antes dos 2 anos de idade, têm sido associada à baixa resposta de IgAS a antígenos específicos destes patógenos (FADEN *et al*., 1994; FADEN *et al*., 1995; YAMANAKA *et al*., 1993). Associações entre a especificidade de anticorpos IgA e a aquisição inicial de patógenos bacterianos sugerem que o sistema imune de mucosas é capaz de modular o estabelecimento de patógenos nas mucosas nasofaríngeas. Por exemplo, um pico na resposta a um Antígeno potencialmente utilizável em vacinas contra *Haemophilus influenzae*, a proteína de membrana externa (OMP) P6, foi detectado em idade precoce (1 a 24 meses) entre crianças que apresentavam curta persistência de colonização por *Haemophilus influenzae*, enquanto que uma resposta fraca a este Antígeno foi observada em crianças colonizadas por maior diversidade de cepas desta bactéria e por períodos mais longos (FADEN *et al*., 1994; FADEN *et al*., 1995; YAMANAKA *et al*., 1993). A persistência de colonização recorrente por cepas de *Haemophilus influenzae* em crianças susceptíveis à otite foi também associada à resposta imune sorológica inadequada ao antígeno OMP P6 na faixa etária de 10 a 25 meses (YAMANAKA *et al*., 1993).

Vários autores estudaram as concentrações de IgA na saliva de crianças nos primeiros anos de vida. Estudo realizado com crianças recém-nascidas nas primeiras 24 horas de vida demonstrou que a concentração média de IgA salivar foi de 19.2µg/ml, sendo que após 2 a 10 dias de vida estes níveis aumentaram para 21.6µg/ml (SEIDEL *et al*., 2000). WAN e colaboradores (2003) mostraram que ao nascimento os valores de concentração de IgA em amostras salivares de bebês variaram entre 0.5 e 12.7µg/ml sendo que estes níveis aumentaram gradativamente do nascimento (média=2.7 ± 4.2µg/ml) aos 18 meses de idade (média=22.4 ± 7.3µg/ml). Estudo prévio, realizado pelo nosso grupo (NOGUEIRA *et al*., 2012), demonstrou que ao nascimento, os níveis de IgA salivar eram

2,5 vezes maiores em crianças a termo (mediana 1,09 µg/ml) quando comparadas a crianças prematuras (mediana 0,78 µg/ml).

Nível médio de 0,15µg/ml de IgA foi detectado na saliva de crianças brasileiras de 6 meses de idade e esse nível aumentou para 0,5µg/ml aos 18 meses de idade (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Entre crianças na faixa etária de 6,5 a 12 anos, a concentração média de IgA é bem mais alta 201µg/ml (GLEESON *et al*., 1995). Em adultos, as concentrações de IgA na saliva variam entre 72µg/ml e 410µg/ml, sendo que a criança atinge níveis semelhantes aos dos adultos aos 7 anos de idade (BRANDTZAEG *et al*., 1989; WAN *et al*., 2003).

A IgM é a segunda imunoglobulina mais encontrada na saliva. Níveis dessa imunoglobulina foram detectados em somente 15% dos bebês de 1 a 6 meses de idade (GLEESON *et al.*, 1986, THRANE *et al.*, 1987; SMITH *et al.*, 1992). SMITH e colaboradores (1989) demonstraram que os níveis de IgM em amostras salivares de crianças diminuiram durante os primeiros 3 a 4 meses de vida, enquanto que os níveis de IgA aumentaram. Deficiências na produção de IgA parecem ser compensadas pela produção e secreção de IgM em crianças de maior idade e adultos (FERNANDES *et al.*, 1995, GLEESON *et al*., 1995). Entretanto, este mecanismo compensatório não foi observado em outro estudo, em crianças durante os primeiros 2 anos de vida (GLEESON *et al*., 1995). Em bebês nascidos prematuramente, a concentração média de IgM em amostras salivares encontrada em um estudo foi de 5.5µg/ml, ligeiramente menor que de bebês nascidos a termo, média= 6.6µg/ml (WAN *et al.*, 2003). No estudo realizado em crianças brasileiras, não houve diferença nas concentrações de IgM na saliva entre grupos de crianças a termo e pré-termo (NOGUEIRA *et al*., 2012).

A imunoglobulina G (IgG) também está presente na saliva, mas em pequena quantidade, como reflexo da imunidade sistêmica, já que esta imunoglobulina vem do plasma sanguíneo, alcançando a cavidade bucal através do líquido crevicular encontrado na interface entre o dente e a gengiva (RUSSELL *et al.*, 1999). Estudo realizado na Austrália por WAN e colaboradores (2003) detectaram IgG na saliva de 61% dos recém-nascidos a termo (AT) estudados e 56% dos recém-nascidos pré-termo (PT), sendo que não houve diferença significante entre seus níveis.

2.2.1. Resposta imune de IgA específica a microrganismos orais

A indução da resposta de IgAS na saliva contra SM poderia ser uma estratégia auxiliar no controle da cárie dentária (CHILDERS *et al*., 2002; RUSSELL *et al*., 1999; CHILDERS *et al.*, 1999). Poucos estudos investigaram o padrão de resposta imune a SM em crianças nos primeiros meses de vida, durante a aquisição inicial destes microrganismos (SMITH *et al*., 1998; CAMLING *et al*., 1987; COLE *et al.*, 1999), considerada como a fase ideal para programas de controle de infecção por SM (RUSSELL *et al*., 1999).

A maioria dos estudos nesta área foi realizada em populações com baixos índices de cárie e baixa frequência de infecção por SM e sugerem que as crianças somente desenvolvem um padrão mais complexo de resposta imune adaptativa a antígenos de SM (definido pela diversidade de antígenos reconhecidos por IgA salivar) a partir dos 2 anos de idade, quando os níveis destas bactérias são detectáveis na cavidade bucal (SMITH *et al*., 1998; COLE *et al*., 1999). Esta baixa complexidade de resposta a SM no primeiro ano de vida não foi decorrente de deficiências na maturação do sistema imunológico das crianças estudadas, uma vez que os padrões de IgA específica a antígenos de *Streptococcus mitis* biovar 1 (SMi), um colonizador primário da cavidade bucal, revelaram alto grau de complexidade (SMITH *et al*., 1998).

Embora estudos sugiram que a redução do risco de colonização bucal por SM após os 2,5 anos de idade ocorra devido ao estabelecimento de uma microbiota comensal competitiva nas superfícies dentárias recém-irrompidas (CAUFIELD *et al*., 1993; CAUFIELD *et al*., 2000; MATTOS-GRANER *et al*., 2001), pouco se sabe sobre o papel da maturação do sistema imune de mucosas na colonização pelo SM na cavidade bucal.

Vários estudos vêm sendo realizados na tentativa de se encontrar proteínas capazes de estimular a produção de anticorpos IgA na saliva contra esses antígenos de superfície e consequentemente reduzir e/ou prevenir a atividade cariogênica (CHILDERS *et al*., 2002; CHILDERS *et al*., 1999; HAJISHENGALLIS *et al*., 1999; CHILDERS *et al*., 1994; JESPERSGAARD *et al*., 1999; NOGUEIRA *et al*., 2008) . Resposta imune a GbpB tem sido encontrada em muitas crianças, mesmo logo após o nascimento (SMITH *et al*., 1998; SMITH *et al*., 1997; SMITH *et al*., 2003), sugerindo o potencial imunogênico desta proteína. Estudos com modelos animais mostraram que a imunização oral ou nasal com GbpB induziu imunidade protetora contra SM. (SMITH *et al*., 1997; SMITH *et al*., 1996).

Um estudo realizado em Piracicaba – SP/Brasil, com população de crianças frequentadoras de todas a creches desta cidade, com idade entre 5-11 meses, revelou que lactentes jovens (por volta dos 5 meses) já apresentavam uma alta complexidade de resposta de IgA aos antígenos de SM, e que as crianças infectadas por este patógeno apresentavam mais frequentemente IgA reativa a Gbpb, sendo que esta diferença não foi observada entre 12 e 24 meses de idade (NOGUEIRA *et al*., 2005). A análise da patogênese molecular da cárie dentária e a identificação de fatores de virulência de SM são importantes para o desenvolvimento de vacinas anti-cárie (JESPERSGAARD *et al*., 1999). Além disso, o entendimento da resposta imune de mucosas em uma idade mais precoce (antes dos cinco meses) se faz necessário para a identificação da idade ideal para a imunização.

Um estudo prévio do nosso grupo com a mesma população do presente estudo, revelou que, apesar de não se detectar, através de análise de checkerboard, a presença de SMI ou SM em amostras de saliva de recém-nascidos no primeiro dia de vida, a maioria das amostras apresentava IgA específica contra antígenos de SMI e SM (NOGUEIRA *et al*., 2012).

2.3. Desenvolvimento do sistema imunológico em neonatos a termo e prematuros

Os linfócitos B são células importantes na resposta imune humoral e quando ativados secretam anticorpos para combater os patógenos por opsonização (LIU E BANCHEREAU, 1997). As imunoglobulinas IgM e Imunoglobulina D (IgD) são co-expressas em linfócitos B imaturos. Após a ativação desses linfócitos ocorre uma mudança de classe para expressar outro isotipo de anticorpo e eles perdem a expressão de IgD. Em recém-nascidos, a capacidade de mudança de classe está reduzida, resultando em linfócitos B que secretam principalmente anticorpos IgM. Isto por que esta mudança de classe é auxiliada pelos linfócitos T que ativam linfócitos B, através da ligação entre CD40 e CD40 ligante. Os linfócitos T de recém-nascidos apresentam redução na expressão de CD40 mesmo quando ativados, resultando numa produção reduzida dos anticorpos IgG e IgA quando comparados aos linfócitos B de adultos (NONOYAMA *et al*., 1995). É ainda maior a redução na expressão de CD40 e CD40 ligante em prematuros. O atraso na expressão dessas moléculas pode diminuir significativamente a resposta imune adaptativa de recém-nascidos prematuros, particularmente no que diz respeito às respostas de anticorpos contra

vários componentes polissacarídeos de bactérias colonizadoras e invasoras e vacinas bacterianas conjugadas (KAUR *et al*., 2007).

No Brasil, a frequência de crianças nascidas prematuramente é maior nas regiões mais desenvolvidas do sudeste que em regiões mais carentes como o nordeste (BETTIOL *et al.*, 2000; MONTEIRO *et al*., 2000; SILVA *et al*., 2001; ARAGÃO *et al*., 2003). Em Ribeirão Preto (SP), nascimentos de PT aumentaram de 7,6% para 13,6% em um intervalo de 15 anos, até meados da década de 90 (BETTIOL *et al*., 2000). Segundo KRAMER e colaboradores (2000), mesmo uma pequena redução na duração da gravidez está associada com um aumento na mortalidade infantil. A evolução tecnológica da medicina tem propiciado aumento na sobrevivência de crianças baixo peso ao nascer (1500-2499 gramas) e de muito baixo peso ao nascer (500-1499 gramas), mas os custos sociais têm sido muito elevados (HACK *et al.*, 1994; SAIGAL *et al.*, 2000).

Está bem estabelecido na literatura que o sistema imune do recém-nascido é imaturo e apresenta várias deficiências. Esta imaturidade está presente tanto nas células da resposta imune inata, com consequente redução na produção de citocinas e fagocitose, quanto na resposta adaptativa, com síntese reduzida de imunoglobulinas. Essas deficiências são ainda mais acentuadas nas crianças nascidas prematuramente (SADEGHI *et al*., 2007; KAUR *et al*., 2007). Dessa forma, todos os recém nascidos, em especial os prematuros, apresentam risco aumentado de infecções quando comparados com crianças mais velhas e adultos jovens (CLAPP *et al*., 2006) .

A potencial associação entre doença periodontal materna e nascimento prematuro é amplamente reconhecida (OFFENBACHER *et al*., 1996; LOESCHE *et al*., 1997; HILL *et al.*, 1998; DASANAYAKE *et al*., 2001; MCGAW *et al*., 2002). Estudos mostram que infecções neonatais por estreptococos, em especial do grupo B, são adquiridas através da transmissão materno-fetal e podem resultar em doenças com altas taxas de mortalidade (JOHRI *et al*., 2006; JORDAN *et al*., 2008; PULVER *et al*., 2009).

Estudos para a caracterização do sistema imune de mucosas em prematuros são ainda escassos, especialmente com relação à resposta imune específica aos micro-organismos orais. No início dessa década, SEIDEL e colaboradores (2000) mostraram que a presença e os níveis medianos de IgA salivar foram semelhantes entre crianças PT (mediana=2,3 µg/ml) e AT (mediana=1.9µg/ml). No entanto, WAN e colaboradores (2003), avaliaram salivas de crianças ao nascimento e aos 18 meses de idade e encontraram algumas diferenças entre PT e AT, como a ausência de IgA mais frequente em crianças

prematuras (69%) do que nas nascidas a termo (56%), o que não aconteceu com os níveis de IgG e IgM. Portanto, existem algumas controvérsias a respeito da ontogenia da IgA em recém nascidos, especialmente em crianças prematuras (HAYES *et al*., 1999).

Nosso estudo prévio demonstrou que 62,5% das crianças a termo e 50% das pré-termo apresentavam IgA específica aos antígenos de SM e SMI. Embora as respostas de IgA específica tenham sido detectadas com maior frequência para os antígenos de SMI, quando comparados aos antígenos de SM, essas diferenças não foram significativas (Teste de Mann - Whitney , $p > 0,05$). Com relação à intensidade das reações, em geral, as crianças AT apresentaram maior intensidade de IgA específica para todos os antígenos testados, mas essas diferenças não foram estatisticamente significativas (teste de Mann-Whitney, $p > 0,2$) (NOGUEIRA *et al*., 2012).

Ainda há pouca informação sobre a colonização bucal em prematuros. Os estudos envolvendo prematuros foram realizados quando essas crianças se encontravam em idades mais avançadas, e apresentavam defeitos na formação do esmalte dental, resultantes de distúrbios de mineralização (FEARNE *et al*., 1990; SEOW *et al*., 1996; LAI *et al*., 1997; SEOW *et al*., 1997; AINE *et al*., 2000; LAW & SEOW, 2006). Tais defeitos no esmalte parecem contribuir para uma predisposição 26 vezes maior de colonização de SM (WAN *et al*., 2003). Aos 24 meses de idade, 94% e 79% de crianças prematuras e não prematuras, respectivamente, eram colonizadas por este microrganismo (WAN *et al*., 2003).

Outro fator responsável pelo o aumento das taxas de infecções nos prematuros são os procedimentos invasivos comumente realizados, como o uso de cateteres intravasculares e a ventilação mecânica. Apesar do intenso uso dos antibióticos, a taxa de morbidade e mortalidade causada por infecções é alta em neonatos (MUSSI-PINHATA *et al*., 2001). Assim, pesquisas buscando novos métodos de diagnóstico rápido, como testes em amostras salivares, com alto grau de sensibilidade e precisão, devem ser implementadas para ajudar na detecção precoce de infecções microbianas em crianças recém-nascidas e possibilitarem uma intervenção mais apropriada e menos invasiva (CLAPP *et al*., 2006).

Neste sentido, torna-se necessário um estudo prospectivo de crianças prematuras e a termo, a fim de se comparar os níveis de imunoglobulinas salivares e o padrão de resposta específica de IgA salivar contra antígenos de SM em crianças antes dos 5 meses de vida.

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar o desenvolvimento de anticorpos salivares, componentes do sistema imune de mucosas, durante o desafio antigênico bacteriano inicial, em crianças nascidas a termo (AT) e pré-termo (PT) em um estudo prospectivo envolvendo duas visitas: ao nascimento, com aproximadamente 10 horas de vida (T0) e aos 3 meses de idade (T3).

Os objetivos específicos do estudo são:

a) Determinar as concentrações salivares de anticorpos IgA e IgM ao nascimento e aos 3 meses de vida, em crianças nascidas AT e PT

b) Determinar os padrões de especificidade dos níveis totais de IgA salivar para antígenos de *Streptococcus sanguinis* (SSA), *Streptococcus mitis* (SMI), *Streptococcus gordonii* (SGO) e *Streptococcus mutans* (SM) ao nascimento e aos 3 meses de vida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento de estudo

Este é um estudo prospectivo observacional realizado no Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, entre outubro de 2007 e maio de 2009. Cinquenta e um recém-nascidos PT saudáveis (idade gestacional < 37 semanas) e 72 recém-nascidos AT saudáveis foram incluídos na primeira avaliação (T0).

A análise prospectiva da resposta imune de mucosas foi realizada aos 3 meses (T3) em 50 crianças (26 FT e 24 PT) provenientes do grupo inicial de 123 crianças. As outras crianças não compareceram para avaliação em T3, mesmo após, pelo menos, 3 agendamentos consecutivos. A idade gestacional foi calculada com base no exame de ultrassom realizado no primeiro trimestre da gestação, ou por meio da avaliação somática do recém-nascido utilizando o Método de CAPURRO e colaboradores (1978). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo (ANEXO 1 - Processo número 2963/2007). Todas as mães autorizaram a participação da criança e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 2). Aos participantes da pesquisa foi garantido o direito de interrupção da participação no estudo em qualquer momento, acesso aos resultados dos exames clínicos e complementares, sigilo absoluto sobre os mesmos.

Informações sobre saúde geral materna e dos recém-nascidos após o nascimento e no período gestacional foram obtidas através de entrevistas com a mãe. As crianças elegíveis para o estudo deveriam estar no alojamento conjunto e apresentando boa saúde geral. Com base nos dados coletados nas entrevistas, não foram selecionadas crianças que apresentavam:

(1) idade superior a 10 horas de vida em T0 e a 3 meses em T3;

(2) malformações congênitas;

(3) instabilidade cardiorrespiratória;

(4) tratamentos prévios com corticóides ou antibióticos;

(5) sinais clínicos de infecção identificados;

Além disso, crianças que haviam sido amamentadas há menos de 3 horas não foram incluídas no estudo

As coletas das amostras salivares, ao nascimento (T0) foram realizadas no alojamento conjunto pelas pós-graduandas Mariana Castro Loureiro Borges e Curi e Maria

Lúcia Talarico Sesso. Após 3 meses da coleta inicial (T3), todas as mães participantes foram convidadas para avaliação e nova coleta de amostra a fim de verificar a evolução do desenvolvimento do sistema imune de mucosa e possível colonização microbiana oral. Esta coleta e a avaliação da cavidade bucal foram feitas na Sala de Atendimento Clínico da Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do HC-FMRP-USP pela pós-doutoranda Ruchele Dias Nogueira (Cirurgiã-Dentista). Outras informações sobre a gestação e saúde geral dos recém-nascidos foram obtidas através da análise dos prontuários clínicos.

Esse estudo é parte de projeto de pesquisa intitulado RESPOSTA IMUNE DE MUCOSAS EM NASCIDOS PRÉ-TERMO (PT) E DE BAIXO PESO AO NASCER (BPN) desenvolvido pela pós-doutoranda Dra Ruchele Nogueira, sob supervisão da Profa Dra Virgínia Paes Leme Ferriani. Resultados iniciais desse projeto foram publicados no artigo *Salivary IgA antibody responses to Streptococcus mitis and Streptococcus mutans in preterm and fullterm newborn children*. Arch Oral Biol. 2012 (6):647-53 (ANEXO 3).

4.2. Coleta de saliva

Amostras de saliva total não estimulada foram coletadas com uma pipeta Pasteur graduada de polipropileno estéril. As amostras foram transferidas para tubos de 1,5ml e colocadas imediatamente em gelo, sendo 10µl de solução 250mM de EDTA adicionados, obtendo-se uma concentração aproximada de 5mM, para inibir a ação de IgA1 proteases e prevenir a formação de complexos Ig-mucinas (FITZSIMMONS *et al*., 1994). A saliva foi clarificada através de centrifugação a 13.000 rpm em microcentrífuga (Eppendorf, EUA) refrigerada (4°C) por 5 minutos e, a seguir, congelada a –70°C. As amostras salivares foram coletadas pelo menos 3 horas após a primeira mamada da manhã para evitar coleta de componentes não salivares.

4.3. Análise dos níveis salivares de imunoglobulinas: IgA e IgM - ELISA

Placas de 96 poços (Costar, EUA) foram sensibilizadas com uma solução de anticorpo IgG de cabra anti-IgA humana purificado (Zymed, EUA) na concentração de 2µg/ml, diluído em tampão I (carbonato-bicarbonato pH 9.6), durante incubação por 2,5 horas a 37°C, seguida de incubação a 4°C durante 14 a 16 horas. A seguir, as placas foram lavadas em Lavador de ELISA (Thermoplate, BR) durante 3 minutos, por 3 vezes, com tampão II (contendo 0,9% cloreto de sódio, 0,05% Tween 20 e 0,02% ázida sódica). Os

poços foram então bloqueados com 100µl de tampão III (fosfato de sódio, 1% albumina bovina, pH 7.5), durante 1 hora, sob agitação, em temperatura ambiente.

Após nova série de lavagens com tampão II, 100µl das amostras salivares diluídas 1:200 em tampão III foram adicionadas por poço em triplicata e as placas foram então incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente e sob agitação. Diluições seriadas de IgA humana purificada (Calbiochem, EUA) nas concentrações de 2,0; 1,0; 0,5; 0,25, 0,125, 0,0625, 0,0312µg/ml, e de duas amostras de saliva controle de adultos e uma de criança foram aplicadas em duplicata às placas, para determinação de uma curva de concentração de IgA humana e controle de reprodutibilidade dos ensaios.

Após incubação com as salivas e padrão de IgA purificada, as placas foram lavadas por 3 vezes durante 3 minutos com tampão II. Adicionaram-se 100µl/poço de solução 1:500 de anticorpos IgG de camundongo anti-IgA humana (Sigma, EUA) e as placas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente, sob agitação e, a seguir, lavadas e posteriormente incubadas com 100µl/poço de solução 1:10.000 de anticorpos IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com biotina (Sigma). As placas foram então incubadas por 2 horas em temperatura ambiente, sob agitação e, a seguir, lavadas como descrito anteriormente. Posteriormente solução de estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina (Sigma) diluída a 1:500 em tampão III foi aplicados nos poços e incubados por 18 horas em temperatura ambiente.

Após nova série de lavagens, as reações de ELISA foram reveladas pela incubação com substrato p-nitrofenilfosfato (Zymed), foi diluído em tampão IV (contendo 0.2M carbonato de sódio, 0.2M Bicarbonato de sódio e 0,02% cloreto de magnésio, pH 9.8). Esta reação, com o substrato, foi desenvolvida por 20, 40 e 60 minutos em temperatura ambiente e as absorbâncias (A_{415nm}) medidas em leitor de ELISA (BioRad-EUA). Os níveis de IgM na saliva foram determinados em todas as amostras coletadas, seguindo-se o mesmo protocolo acima para IgA. No entanto, utilizaram-se anticorpos monoclonais de camundongo IgG1 anti-IgM humana (Zymed), nas diluições 1:500. Curvas padrão foram obtidas, utilizando-se amostras de IgM humana purificada (Calbiochem) nas concentrações de 2,0; 1,0; 0,5; 0,25, 0,125, 0,0625, 0,031µg/ml. Como controles negativos, foram utilizados poços das mesmas placas não sensibilizados e poços sensibilizados, mas não incubados com saliva. Os valores médios de absorbância dos controles negativos foram descontados dos valores da absorbância das amostras testadas. Uma curva de concentração de IgA e IgM por unidade de ELISA foi determinada a partir das reações das

amostras de IgA e IgM purificada. Estas curvas foram utilizadas para determinação das concentrações de IgA e IgM nas amostras de saliva.

4.4. Análise das concentrações de proteínas das amostras salivares

Para controle da interferência de variações do fluxo salivar nos níveis totais de IgA, as quantidades de IgA salivar determinadas nos ensaios de ELISA foram normalizados pelas concentrações de proteína das amostras de saliva testadas. Para isto, as concentrações de proteínas salivares foram determinadas através do método de Bradford, utilizando-se os reagentes do kit de Bradford (Biorad). Resumidamente, 1ml de saliva clarificada diluída (1:161) em água destilada foi misturada a 1ml de reagente de Bradford em cubetas plástica descartável. Após incubação a temperatura ambiente durante 5 minutos, as absorbâncias das amostras (A_{595}nm) foram medidas em espectrofotômetro digital (Thermo Scientific, EUA). Uma curva padrão, de concentração de proteínas, foi obtida a partir da medida das A_{595}nm de 5 diluições seriadas de BSA (Sigma) em concentrações entre 10 a 1,25mg/ml. A linearidade das reações foi determinada a partir da equação de regressão linear da curva de BSA (r=0,9996, y=0,0375x+0,0194), a qual foi utilizada para determinação das concentrações de proteínas das amostras salivares. Como controle negativo utilizou-se volumes de água destilada iguais aos das amostras de saliva diluídas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5. Ensaios para análise da complexidade de resposta de IgA contra antígenos de SM, SMI, SSA e SGO.

4.5.1. Preparação de antígenos bacterianos.

Os padrões de reatividade de anticorpos IgA contra antígenos de SM (UA159), SMI (ATCC506), SGO (ATCC10558) e SSA (ATCC29667) foram utilizados para os ensaios de Western blot. Os antígenos foram extraídos de culturas destes microrganismos em caldo Todd Hewith (Difco) obtidas após incubação a 37°C durante 48 h. Células de 15ml das culturas com absorbâncias ajustadas para A_{600nm}=1 foram então separadas através de centrifugação a 1.000 x g a 4°C. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e os precipitados de células acrescidos de água destilada e de tampão desnaturante 0,25M Tris HCl pH 6.8 (contendo 8% SDS, 20% de ditiotreitol 1M, 30% de glicerol e 0,2% de azul de

bromofenol) na proporção de células de 1ml de cultura para 15ul de H_2Od e 15ul de tampão desnaturante. As suspensões celulares foram então fervidas durante 5 minutos para extração das proteínas e inativação de proteinases. A seguir os extratos foram imediatamente colocados em banho de gelo e congelados a –70° C. A padronização das concentrações de antígenos destes extratos foi determinada através de quantificação das proteínas pelo método de Bradford, como descrito anteriormente. Para monitoramento do padrão de antígenos destes extratos, alíquotas dos mesmos foram analisadas em géis de poliacrilamida-SDS corados com Coomassie Blue R 250.

4.5.2 Análise da complexidade da resposta de IgA salivar contra antígenos bacterianos em ensaios de Western blot.

Os padrões de antígenos bacterianos que foram selecionados (Tabela 1) foram comparados entre crianças nascidas a termo e prematuras. Os experimentos de *western blot* foram realizados com alíquotas das salivas estocadas a -70°C. Para isto, 16 microgramas de proteínas das preparações de antígenos descritas no item 4.5.1 foram separadas por 3 horas a 24 mA/gel em géis de poliacrilamida-SDS a 6% e preparados com auxílio de sistema de mini-géis Mini Protean II (BioRad). Após separação eletroforética das proteínas nos géis em duplicata, um destes foi corado com Coomassie Blue R250 (Sigma, USA) para análise do padrão dos antígenos separados e o outro foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (BioRad, USA) durante 1,5h a 50V constantes, com auxílio de aparato Mini Trans Blot (Bio Rad, USA) e posteriormente corada com Red Ponceau, para verificação da transferência. Padrões de pesos moleculares pré-corados (BioRad) foram incluídos em todos os géis.

As membranas de nitrocelulose contendo os antígenos bacterianos foram então bloqueadas através de incubação a 4°C "overnight" com tampão de bloqueio TBST (100mM Tris com 10% Tween) pH 7.5 contendo 5% de leite desnatado. A seguir, as mesmas foram incubadas com as salivas diluídas 1:100 no mesmo tampão durante 2 horas, a temperatura ambiente e sob agitação. Como controles negativos, membranas duplicata foram incubadas apenas com TBST mais 5% de leite e como controle positivo, as membranas foram incubadas com saliva de um adulto cujo padrão de resposta aos antígenos estudados já havia sido estabelecido anteriormente (Nogueira et al., 2007) Após 6 lavagens de 5 minutos cada com TBST pH 7.5, as membranas foram incubadas por 2

horas sob agitação a temperatura ambiente, com de anticorpo purificado de cabra anti-IgA humana conjugado com peroxidase (Zymed, USA), diluído 1:4000 em TBST com 5% de leite. Nova série de 6 lavagens durante 5 minutos cada foi então realizada. A seguir, as reações com anticorpo secundário foram reveladas usando-se o sistema quimioluminescente ECL (Amersham Pharmacia).

As bandas de antígenos reconhecidos por IgA salivar foram detectadas através da exposição de filmes de raios X (Kodak) às membranas durante 5 minutos. Após a revelação dos filmes sensibilizados, imagens digitais de alta resolução dos mesmos foram capturadas em *scanner* de densitometria (BioRad GS-700, Imaging Densitometer), para obtenção das medidas de intensidade das bandas reativas.

Tabela 1. Antígenos bacterianos estudados

Espécies de Bactérias	Antígenos	Peso Molecular (kDa)
Streptococcus mitis (SMI)	**IgA1-protease**	202 kDa
Streptococcus gordonii (SGO)	**Gtf**	153 kDa
Streptococcus sanguinis (SSA)	**Gtf**	170kDa
Streptococcus mutans (SM)	**Ag I/II**	185 kDa
	Gtf	160 kDa
	GbpB	56 kDa

IgA1-protease: Imunoglobulina A1-protease
Gtf: Glicosiltransferase
GbpB: Glucan binding protein B
Ag I/II: Antígeno I/II

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Associações entre as concentrações de IgA, IgM e proteínas totais e padrões de resposta de anticorpos foram analisadas através da Correlação de Spearman. Comparações das frequências de crianças com diferentes anticorpos IgA específicos e o número médio de bandas de IgA específicas aos antígenos foi também determinado e realizada comparação entre os subgrupos de crianças PT e AT através do Teste do qui-quadrado e Mann-Whitney. As diferenças entre os valores de densitometria das bandas reativas aos diferentes antígenos entre os grupos de crianças PT e AT foram analisadas por teste de Mann-Whitney, e entre as visitas através do teste de ANOVA. O valor de $p<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6. RESULTADOS

6.1. População do estudo.

As características demográficas dos 123 neonatos incluídos ao nascimento estão listadas na Tabela 2. A idade gestacional média foi de 34 semanas e 4 dias para crianças PT (intervalo: 33 - 36 semanas e 6 dias) e 39 semanas e um dia para o grupo AT (intervalo: 37 semanas e 2 dias - 40 semanas e 6 dias). A idade gestacional média e comprimento ao nascer, como esperado, foram significantemente diferentes entre crianças PT e AT ($p<0,05$). Cor da pele, sexo e peso ao nascer não foram diferentes entre os grupos ($p>0,05$).

Tabela 2. Características demográficas das crianças incluídas no estudo ao nascimento (média ± DP).

	Crianças pré-termo (PT: *n*=51)	Crianças a termo (AT: *n*= 72)	*p valor*
Idade gestacional (semanas)	34.5 ± 2.2	39.1 ± 1.4	<0.005*
Peso ao nascimento (Kg)	2.3 ± 0.3	3.2 ± 0.5	0.232
Comprimento ao nascimento (cm)	44,2 ± 2,1	49,1 ± 2,4	<0,01*
Sexo M/F	22/29	37/35	0.324
Cor da pele B/N	40/11	51/21	0.356

*Mann-Whitney, *p*<0.05

B = Branca N = Negra; M = Masculino, F = Feminino

6.2. Níveis de IgA, IgM e proteínas nas amostras salivares ao nascimento e aos 3 meses de vida

As imunoglobulinas A e M foram detectadas nas salivas de todos os 123 recém-nascidos AT e PT incluídos nesse estudo. Em T0, os níveis médios de IgA, IgM e a concentração de proteína nas amostras de saliva (n = 123) foram 2,39 μg /ml (± 7,59), 1,53 μg/ml (± 4,54) e 944,5 μg/ml (± 870,2), respectivamente. Houve uma associação positiva entre os níveis de IgA e IgM em ambos os grupos (correlação de Spearman: r> 0,7, p <0,001) e entre as concentrações de IgA e IgM e amostras de proteínas

totais (correlação de Spearman: r> 0,81, p <0,001 e r = 0,72, p <0,001, respectivamente, para IgA e IgM).

Os níveis de IgA, IgM e das proteínas totais em amostras de saliva de AT e PT analisados prospectivamente estão listados na Tabela 3 e Figura 1. A Figura 1 mostra a variação dos níveis de imunoglobulinas e proteínas. A Figura 2 mostra os níveis médios de IgA (A) e IgM (B) e os valores normalizados pela quantidade de proteínas em amostras de saliva de 50 (24 de PT e 26 FT) crianças que participaram de todo o período de acompanhamento de três meses (T0 e T3). Não houve diferença (P>0.05) dos níveis salivares de IgA e IgM entre bebês AT e PT ao nascimento. Em T3, os valores médios de IgA foram similares entre os grupos, e os níveis de IgM foram significativamente maiores no grupo PT do que AT (P<0,05). No entanto, estes valores não diferiram quando normalizados pelas proteínas (p>0.05). A análise prospectiva dos níveis salivares de IgA e IgM mostrou aumento estatisticamente significativo em ambos os grupos (p<0,01), quando comparados os valores ao nascimento (T0) e aos 3 meses de vida T3 (Figura 2).

Tabela 3. Concentrações de IgA, IgM e concentração total de proteínas (em ug/mL) na saliva de crianças nascidas a termo e pré-termo, ao nascimento (T0) e aos 3 meses (T3). Valores estão expressos em medianas (valores mínimos e máximos).

	TO			T3		
	PT n=24	AT n=26	p	PT n=24	AT n=24	p
Níveis de IgAS mediana (limites)	0,78 (0-12,45)	0,7 (0,15-10,38)	0,28	2,95 (0,81-23,42)	3,10 (0,81-21,53)	0,26
Níveis de IgM mediana (limites)	0,47 (0,03-9,94)	0,37 (0,09-5,11)	0,37	8,01 (0,73-26,56)	2,13 (0,14-24,4)	0,01
Níveis de Proteínas mediana (limites)	914,31 (257,56-2020,71)	785,59 (38,43-2161,77)	0,11	457,49 (156,43-1750,98)	288,05 (147,35-1275,95)	0,07
IgAS/prot mediana (limites)	0,10 (0-0,78)	0,14 (0,01-1,67)	0,39	0,84 (0,09-9,71)	0,95 (0,22-10,81)	0,09
IgM/prot mediana (limites)	0,05 (0-1,02)	0,06 (0,01-0,42)	0,43	1,17 (0,16-13,36)	0,82 (0,07-5,01)	0,07

* Mann-Whitney, *p*<0.05

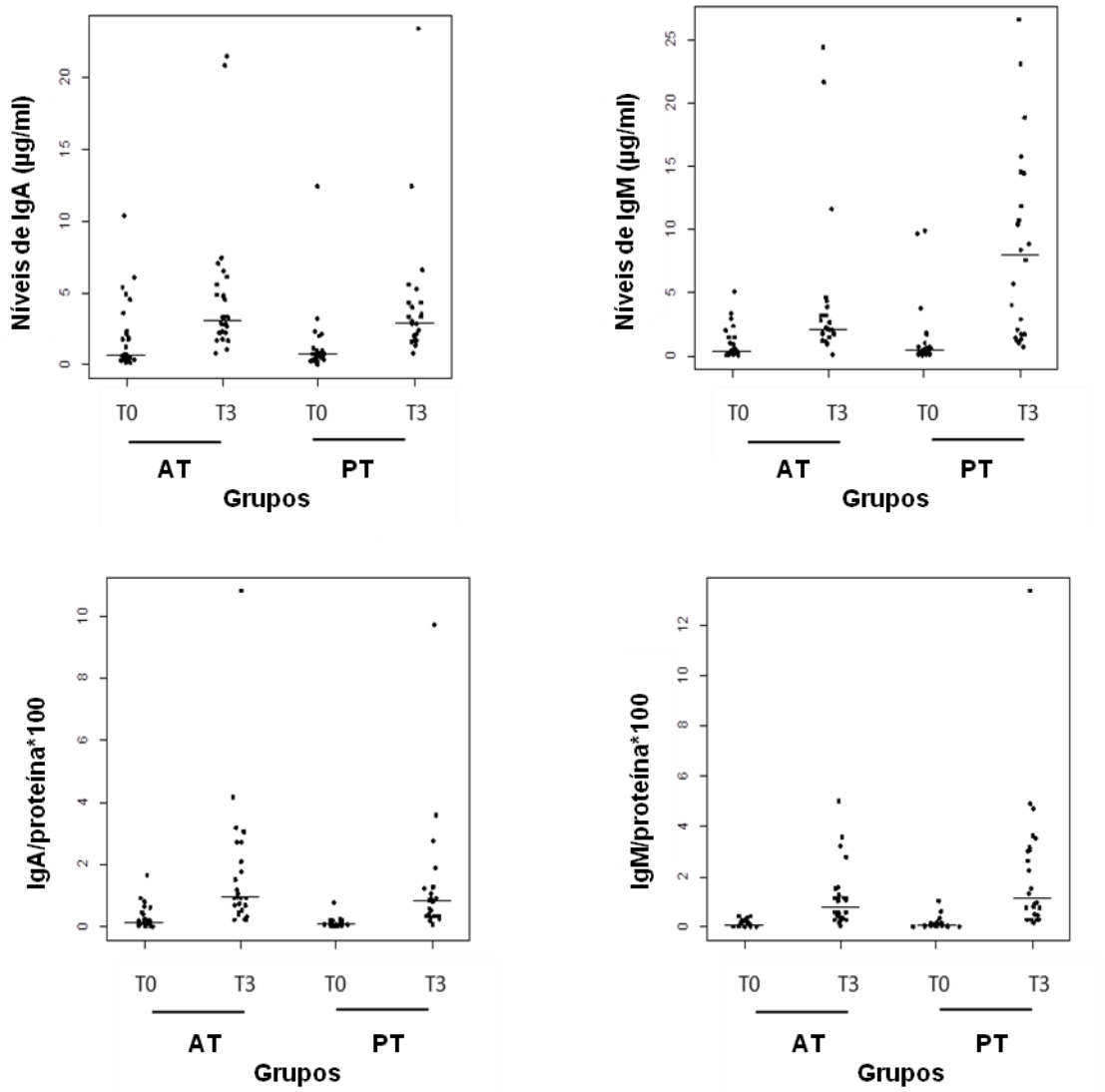
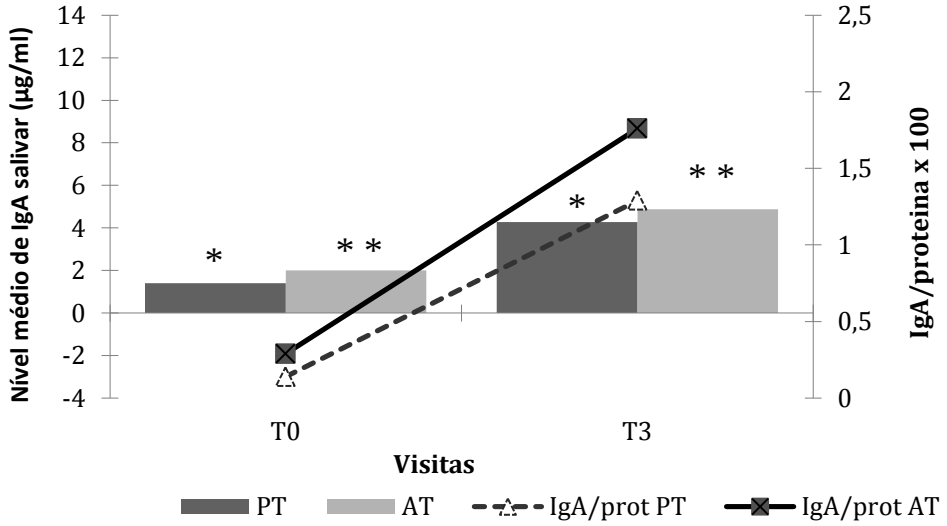
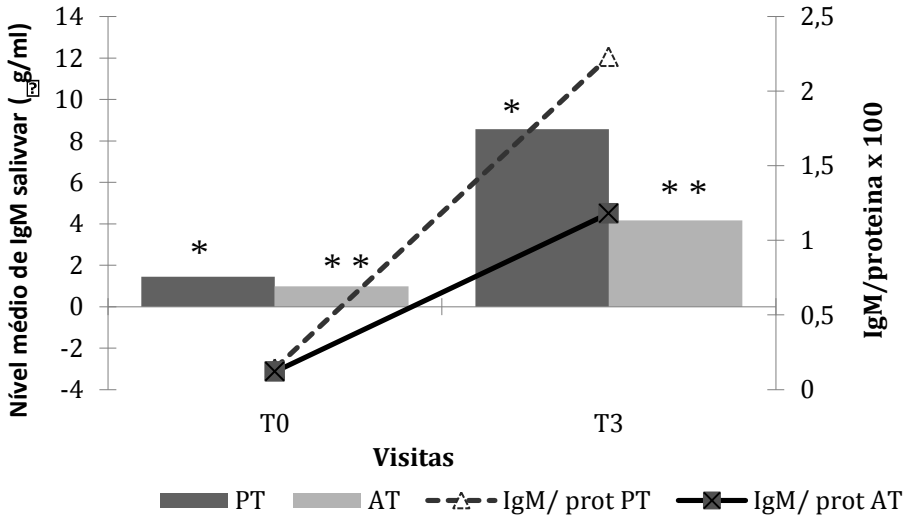


Figura 1 – Concentrações de IgA e IgM na saliva, e concentrações normalizados pelas proteínas em crianças a termo AT e pré-termo PT, ao nascimento (T0) e aos 3 meses de vida (T3) (n=50). As barras horizontais representam as medianas.

A



B



***ANOVA p<0,01**

****ANOVA p<0,01**

Figura 2. Níveis médios de IgA (A) e IgM (B) e níveis corrigidos pela concentração de proteínas nas amostras salivares ao nascimento (T0) e aos 3 meses de idade (T3).

A Tabela 4 mostra as características demográficas e os níveis de IgA e IgM salivar, medidos ao nascimento, das crianças que participaram da avaliação prospectiva (n=50) e daquelas que não comparecerem em T3 (n=73). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre estas crianças nos dados apresentados na Tabela 4 (p>0.05).

Tabela 4. Características demográficas e níveis de IgA e IgM salivar ao nascimento das crianças incluídas (26 AT e 24 PT) e das que não participaram da avaliação prospectiva, aos 3 meses de idade (46 AT e 27 PT)

	AT			**PT**		
	I n=26	**NI n=46**	**p**	**I n=24**	**NI n=27**	**p**
Idade gestacional (semanas)	39 ± 1,2	39,2 ± 1,4	0.9	34,8 ± 1,6	34,7 ± 1,2	0.8
Peso ao nascimento (Kg)	3,1± 0,6	3,1 ± 0,5	0.8	2,3 ± 0,4	2,3 ± 0,3	0.8
Comprimento ao nascimento (cm)	48,9 ± 2,5	48,5 ± 2,2	0.3	46,3± 6,3	44,3 ± 1,3	0.5
Sexo M (%)	10 (38,5)	27 (58,7)	0.1	7(29,2)	15(56)	0.2
Cor da pele Branca (%)	15 (57,7)	26 (56,6)	0.3	20 (83,3)	20 (74,1)	0.3
IgA em T0	2,00 ± 2,42	2,56 ± 3,25	0.3	1,40 ± 2,43	1,57 ± 2,23	0.1
IgM em T0	0,98 ± 1,2	1,2 ± 5,7	0.5	1,4 ± 2,6	1, ± 2,3	0.5

* Mann-Whitney AT= a termo PT=pré-termo I=incluidas NI= não incluidas

6.3. Detecção de IgA específica aos antígenos bacterianos nas amostras salivares.

Para análise da complexidade da resposta de IgA salivar aos antígenos bacterianos foram realizados ensaios de *western blot* em amostras de 50 crianças (26 AT e 24 PT). Exemplos de imuno-ensaios realizados em amostras de saliva, representativos de crianças PT e AT contra antígenos de SM, SMI, SGO e SSA em T0 e T3 estão demonstrado na Figura 3.

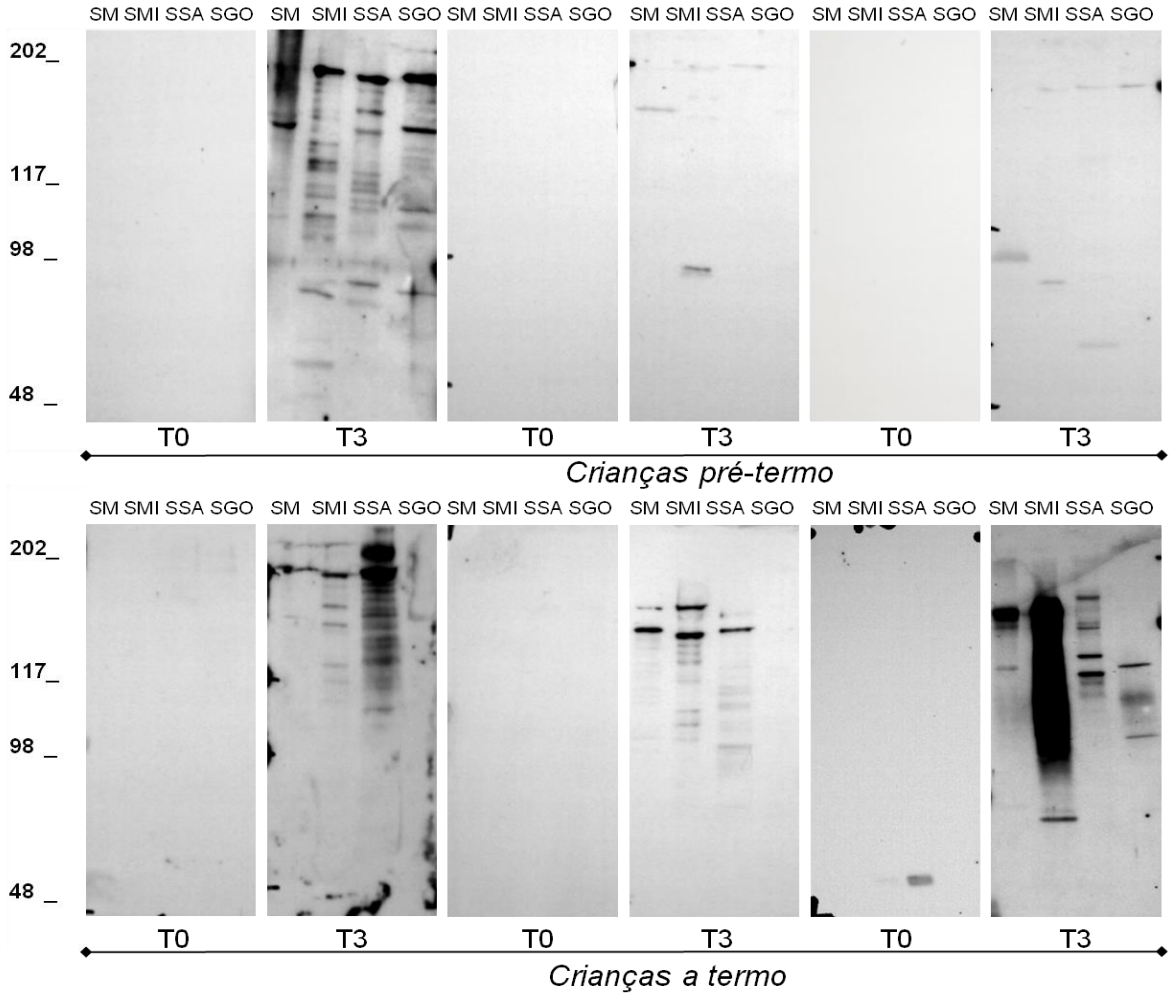


Figura 3. Especificidade de IgA salivar contra antígenos de *Streptococos mutans* (SM), *Streptococos mitis* (SMI), *Streptococos sanguinis* (SSA) e *Streptococos gordoni* (SGO) em 3 crianças a termo (AT) e 3 crianças pré-termo (PT), ao nascimento (T0) e aos 3 meses de vida (T3). Padrões de pesos moleculares (em kDa) estão indicados à esquerda.

A Tabela 5 apresenta as frequências de crianças com IgA detectáveis aos antígenos específicos, e o número de bandas de IgA específica aos antígenos com pesos moleculares de 153 kDa de SGO , 170 kDa de SSA, 202 kDa de SMI e 185, 160 e 56 kDa de SM no grupo de crianças AT e PT, ao nascer e aos 3 meses. Nota-se que a frequência de crianças que apresentaram resposta IgA positiva para estes antígenos bacterianos, variou bastante. Cabe destacar que pelo menos 50% das crianças AT e PT apresentaram resposta positiva para antígenos das espécies SSA e SMI ao nascimento e aos 3 meses. Além disso, pelo menos 50% das crianças PT apresentaram resposta IgA específica para antígenos de SGO e também para SM em ambas avaliações.

A análise dos resultados obtidos ao nascimento mostrou que a frequência de IgAS para o antígeno de 170 kDa de SSA foi maior nas crianças PT, e para o antígeno 185kDa de SM foi maior no grupo AT ($p < 0,05$). Na avaliação aos 3 meses, de uma forma geral, a resposta de IgA para antígenos em crianças AT foi mais frequente e complexa do que no grupo de crianças PT. IgA específica para os antígenos 153 kDa de SGO, 202 kDa de SMI e 160 kDa de SM foi mais frequentemente encontrada em crianças AT do que entre os PT ($p<0,05$). Além disso, a frequência de crianças e o número médio de bandas de IgA contra SSA foram significativamente maiores no grupo de crianças AT quando comparadas às PT (Qui-quadrado, $p<0,05$, e Mann-Whitney, $p < 0,05$).

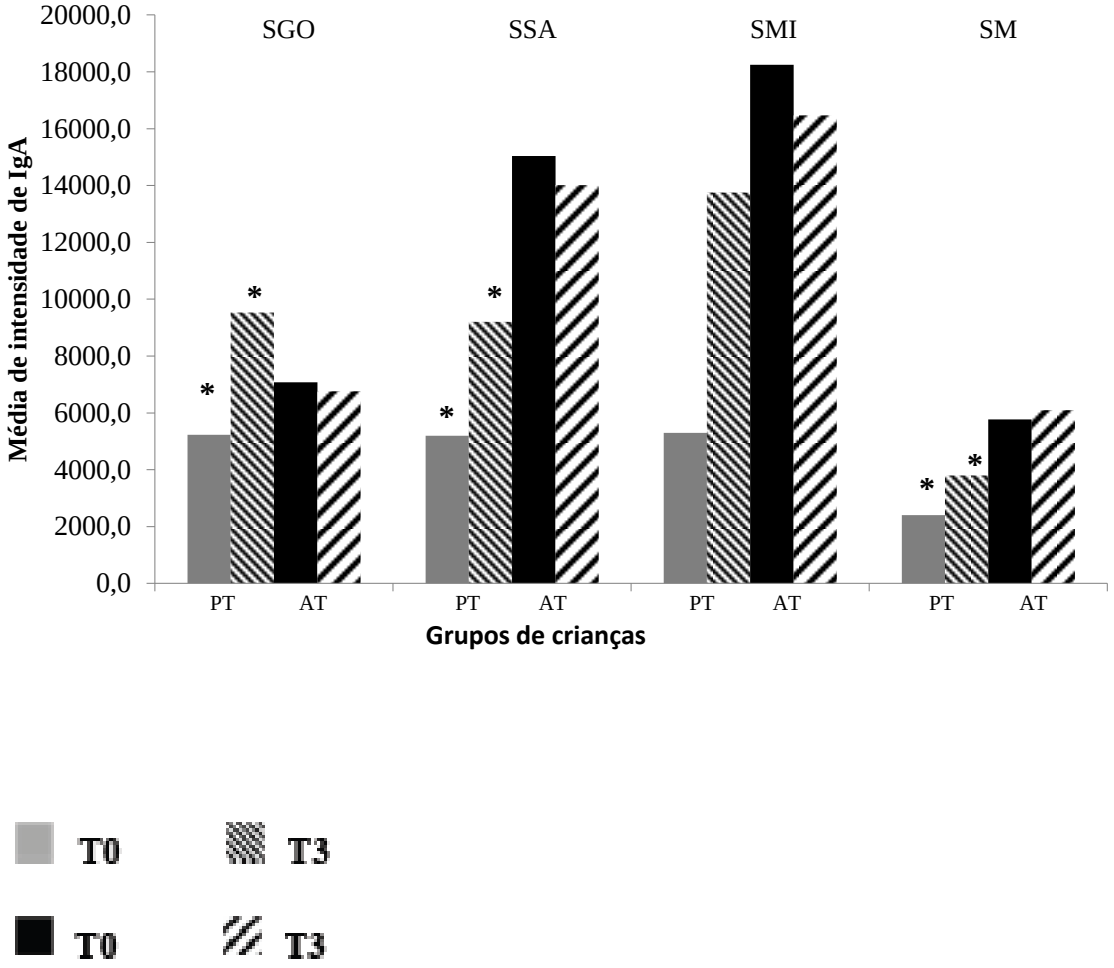
Tabela 5. Comparação da frequência de crianças que apresentaram IgA específica na saliva para antígenos de *S. gordonii* (SGO), *S. sanguinis* (SSA), *S. mitis* (SMI) e *S. mutans* (SM), nos grupos de crianças pré-termo (PT) e a termo (AT) e o número médio de antígenos reconhecidos em cada grupo.

Antígenos	**Número (%) de crianças com IgA específica positiva na saliva**			
	PT (n=24)		**AT (n=26)**	
	T0	**T3**	**T0**	**T3**
Streptococcus gordonii (SGO)	13 (54,1%)	12 (50%)	15 (41,6%)	17 (65,3%)
153 KDa Ag	6 (25%)	4 (16,6%)[a]	8 (30,7%)	11 (42,3%)[a]
Número médio de bandas reativas ± DP	1.9 ± 3,2	1,8 ± 3,2	1,7 ± 1,9	1,8 ± 1,7
Streptococcus sanguinis (SSA)	15 (62,5%)	13 (54,1%)[b]	20 (76,9%)	21 (80,7%)[b]
170 KDa Ag	6 (25%)[f]	5 (20,8%)	4 (15,4%)[f]	7 (26,9%)
Número médio de bandas reativas ± DP	2,2 ± 2,5	2,0 ± 2,9[e]	3,1 ± 3,4	3,5 ± 3,5[e]
Streptococcus mitis (SMI)	14 (58,3%)	12 (50%)	19 (73%)	18 (69,2%)
202 KDa Ag	3 (12,5%)	5 (20,8%)[c]	6 (23%)	14 (53,8%)[c]
Número médio de bandas reativas ± DP	2,5 ± 3,6	2,8 ± 4,0	3,8 ± 4,3	4,15 ± 3,2
Streptococcus mutans (SM)	13 (54,1%)	12 (50%)	12 (46,1%)	13 (50%)
185 KDa Ag	1 (4,1%)[g]	2 (8,3%)	3 (11,5%)[g]	5 (19,2%)
160KDa Ag	5 (20,8%)	2 (8,3%)[d]	4 (15,4%)	8 (30,7%)[d]
56KDaAg	1 (4,1%)	1 (4,1%)	0	3 (11,5%)
Número médio de bandas reativas ± DP	1,1 ± 1,3	1,0± 1,2	1,6 ± 2,2	2,0 ± 2,3

[a]Diferença significativa entre grupo PT e AT; Qui-quadrado: p≤0.05, q: 3.9
[b]Diferença significativa entre grupo PT e AT; Qui-quadrado: p≤0.05, q: 4.0
[c]Diferença significativa entre grupo PT e AT; Qui-quadrado: p≤0.05, q: 5.8
[d]Diferença significativa entre grupo PT e AT; Qui-quadrado: p≤0.05, q: 3.9
[e]Diferença significativa entre grupo PT e AT; Mann-Whitney: p≤0.05
[f]Diferença significativa entre grupo PT e AT; Qui-quadrado: p≤0.05, q: 9.5
[a]Diferença significativa entre grupo PT e AT; Qui-quadrado: p≤0.05, q: 11;3

6.4. Intensidade da resposta específica de IgA aos antígenos bacterianos nas amostras salivares.

Medidas de densitometria de cada banda específica de IgA foram realizadas para determinar a intensidade de reações IgA aos diferentes antígenos. Houve variação nas intensidades e no número de bandas reativas de IgA específica aos antígenos bacterianos estudados entre as crianças de ambos os grupos, quando comparados os dois períodos do estudo, ao nascimento e aos 3 meses de vida (Figura 4).



*Mann-Whitney, p<0.05

Figura 4. Intensidade das reações de IgA (médias) aos antígenos de SGO, SSA, SMI e SM em crianças pré-termo (PT) e a termo (AT) ao nascimento (T0) e aos 3 meses (T3).

Após a análise dos dados de intensidade, ficou claro que alguns antígenos como os de SSA , SGO e SMI foram mais fortemente reconhecidos pelas crianças. Em geral, as crianças AT apresentaram maior intensidade de resposta IgA específica para todos os antígenos testados, quando comparadas às crianças PT, mas essas diferenças não foram estatisticamente significativas (Mann-Whitney, $p > 0,2$), em ambas as visitas. A análise prospectiva mostrou que, no grupo PT, a intensidade média de resposta de IgA a SM, SGO e SSA foi significantemente maior aos 3 meses, do que ao nascimento (Figura 4, ANOVA , $P<0,05$). Ao analisar o grupo de crianças AT, a intensidade total de IgA específica para os antígenos não foi significantemente diferente em T0 quando comparado a T3 (Figura 4 , ANOVA , $P > 0,005$).

A intensidade média de resposta de IgA salivar a cada um dos antígenos das diferentes espécies de estreptococos testados está demonstrada na Figura 5. Em T0, não houve diferença na intensidade da resposta de IgA para os antígenos específicos entre os grupos. Aos 3 meses (T3), a média da intensidade da resposta de IgA para o Ag 202 kDa de SMI foi significativamente mais elevada em crianças AT, em comparação com as PT (ANOVA, $p< 0,05$). Quando as respostas de T0 e T3 foram comparadas, as crianças PT apresentaram resposta significativamente maior de IgA a 185 kDa de SM em T3 (ANOVA, $p< 0,05$). Além disso, a intensidade média de resposta de IgA a 202 kDa de SMI no grupo de crianças AT foi significativamente maior em T3 (ANOVA , $p< 0,05$).

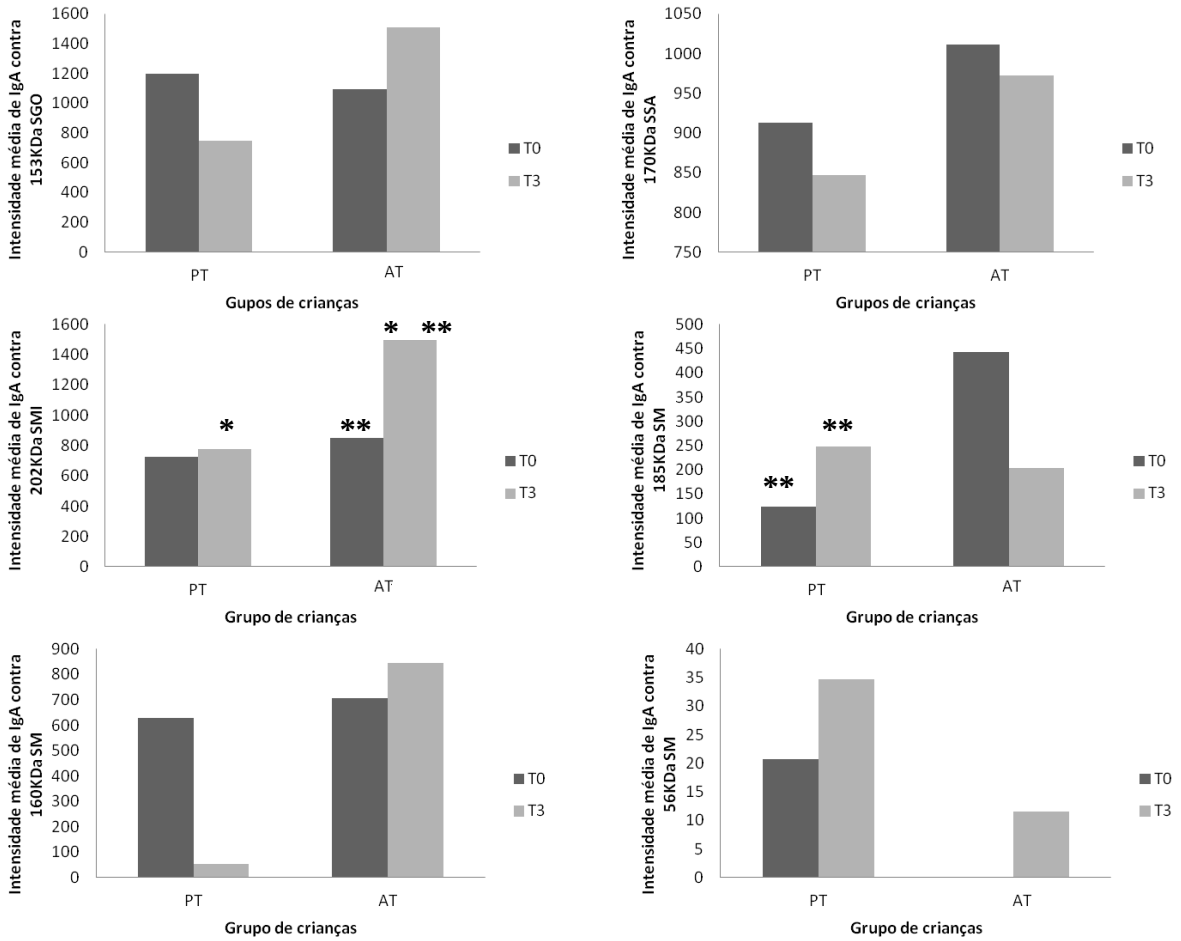


Figura 5 – Intensidade média de IgA contra os antígenos específicos, comparando o grupo de crianças prematuras (PT) e a termo (AT), ao nascimento (T0) e aos 3 meses de vida (T3).

*Mann-Whitney, $p<0.05$

**ANOVA, $p<0.05$

7. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a ontogenia dos anticorpos presentes na saliva nos primeiros meses de vida por meio da determinação dos níveis de IgA e IgM em crianças nascidas AT e PT, ao nascimento (T0) e aos 3 meses de vida (T3). Um total de 123 crianças participaram da avaliação ao nascimento e 50 delas foram avaliadas prospectivamente aos 3 meses. Além disso, analisou-se a complexidade da resposta IgA, medida pelo número de bandas reativas e intensidade de resposta, contra microrganismos colonizadores iniciais da cavidade bucal (*Streptococcus sanguinis, Streptococcus gordonii e Streptococcus mitis*) e *Streptococcus mutans* (principal agente etiológico da cárie dentária).

Em ambos os grupos (AT e PT) os níveis de imunoglobulinas salivares aumentaram do momento do nascimento aos 3 meses de idade. Em relação aos níveis de IgA, houve um aumento de 3,0 e 2,4 vezes em PT e AT, respectivamente. Os níveis de IgM também aumentaram de T0 para T3, sendo que esta diferença foi significantemente maior nas crianças PT.

Estudo prévio do nosso grupo, mostrou que níveis salivares de IgA e IgM são detectados em recém-nascidos no primeiro dia de vida (NOGUEIRA *et al*., 2012), a exemplo do que havia sido observado em estudos realizados em outros países (SEIDEL *et al*., 2000; WAN *et al*., 2003; MARUYAMA *et al*., 2009). Além disso, observou-se que os níveis de IgA em prematuros eram significativamente menores do que os encontrados em recém-nascidos a termo (NOGUEIRA *et al*., 2012), sugerindo diferenças no desenvolvimento do sistema imunológico adaptativo de mucosa em crianças nascidas com diferentes idades gestacionais.

Sabe-se que linfócitos T de recém-nascidos tem expressão reduzida de CD40 ligante mesmo quando ativados (NONOYAMA *et al*.,1995). Além disso, linfócitos B de sangue de cordão de recém-nascidos AT, e principlamente de PT, apresentam menor expressão de CD40, quando comparados a linfócitos B de adultos, o que resulta em diminuição da produção de anticorpos IgG e IgA e diminuição significativa da resposta imune adaptativa de recém-nascidos prematuros, o que pode resultar em susceptibilidade maior a infecções por bactérias e resposta diminuída a vacinas bacterianas (KAUR *et al*., 2007).

Estudo prévio, mostrou que a população brasileira é altamente exposta a microrganismos orais (ALVES *et al*., 2009), sendo que algumas espécies, como SMI, SGO e SSA colonizam a cavidade bucal, logo após o nascimento, sem causar nenhuma doença local específica. No entanto, sabe-se que estes micro-organismos podem causar endocardite bacteriana (VACCA-SMITH *et al*., 1994). Alguns antígenos de virulência já descritos para essas espécies são: 153kDa- Gtf de *Streptococcus gordonii* (VACCA-SMITH *et al*., 1994), 170 kDa-Gtf de *Streptococcus sanguinis* (VACCA-SMITH *et al*., 2000) e 202 kDa-IgA1-protease de *Streptococcus mitis* (POULSEN *et al*., 1998).

Por outro lado, a colonização precoce por *Streptococcus mutans* representa um grande problema por ser essa bactéria responsável pelo desenvolvimento de cáries. SM é um micro-organismo que tem habilidade para se acumular em biofilmes e produzir ácidos que destroem a superfície dentária. Vários antígenos de virulência importantes para essa ação já foram descritos: o AgI/II de 185 kDa, Gtf de 160kDa e a GbpB com 56 kDa (DEMUTH *et al*., 1988; . HANADA & KURAMITSU *et al*., 1988; MATTOS - GRANER *et al*., 2001). Estes antígenos são frequentemente estudados como alvos para elaboração de vacinas anti-cárie, e anticorpos IgA específicos contra estes microrganismos presentes na saliva podem ser essenciais para o controle da infecção pelo SM.

Neste sentido, avaliamos também no presente estudo a especificidade da IgA contra estas bactérias orais.

Nossos resultados mostram a presença de anticorpos IgA reativos a vários antígenos destas bactérias, já ao nascimento. Interessante destacar que em estudo anterior do nosso grupo, não se conseguiu demonstrar a presença dessas espécies de bactérias orais em crianças recém-nascidas, por meio da técnica de *checkerboard* (NOGUEIRA *et al*., 2012). A mesma pesquisa foi realizada aos 3 meses, utilizando-se a mesma técnica, e ainda assim, nenhuma das crianças apresentou níveis detectáveis de SMI, SSA, SGO ou SM (BORGES *et al*., 2014).

A presença destes anticorpos, na ausência de colonização pelas bactérias orais, poderia, a princípio, ser consequente à estimulação antigênica por meio da amamentação, já que DNA bacteriano de estreptococos, estafilococos, bactérias lácticas e bifidobactérias já foi detectado em amostras de leite humano (PETRECHEN *et al*., 2015, MARTÍN *et al*., 2007; BEARFIELD *et al*., 2002). Mas é pouco provável que estes anticorpos encontrados nas primeiras 10 horas de vida , tenham sido produzidos pelos recém-nascidos, já que esse tempo não é suficiente para que ocorra todo o processo de absorção e processamento

antigênico, seleção de células B, diferenciação em plasmócitos, secreção de anticorpos e transferência endossomal para o lúmen das glândulas salivares.

Uma outra explicação seria a de que estes anticorpos seriam resíduos de IgA do leite materno, mesmo que as amostras tivessem sido coletadas 3 horas após a amamentação. No entanto, análises comparativas entre o perfil de resposta de IgA da saliva de algumas crianças com as do colostro das respectivas mães mostrou que a maioria dos antígenos que eram mais frequentemente reativos nas amostras das crianças não foram reconhecidos pelo leite materno (NOGUEIRA *et al*., 2012).

Outra hipótese seria a de que a transferência de antígenos bacterianos da mãe para o recém-nascido ocorre através do sangue do cordão umbilical, durante a gestação. Alguns estudos na literatura sugerem que os recém nascidos não são completamente estéreis e que existe um efluxo de bactérias comensais de mãe para filho (MARTÍN *et al*., 2003). JIMENEZ *et al*. identificaram, em amostras de sangue do cordão umbilical, a presença de *E. faecium, Propionibacterium acnes, Staphylococcus epidermidis e Streptococcus sanguinis*. Curiosamente, estas espécies estão presentes em crianças desde os primeiros dias de vida e são geralmente consideradas como organismos comensais em crianças saudáveis, embora em algumas delas possam causar infecções oportunistas (MARTÍN *et al*., 2003; JIMÉNEZ *et al*., 2005). Outros estudos mostraram, em recém-nascidos, a presença de citomegalovírus (ENDO *et al*., 2009) e papilomavírus (ROMBALDI *et al*., 2009) em amostras de sangue de cordão umbilical. Desta forma, as espécies de bactérias testadas no presente estudo poderiam ter sido apresentadas ao feto na vida intra-uterina e, assim, estimulado o desenvolvimento do sistema imune de mucosa. No entanto, tanto quanto sabemos, não há relato de resposta humoral específica para as espécies de bactérias testadas no presente estudo, em sangue de cordão umbilical.

A análise prospectiva da especificidade da resposta de IgAS nas crianças do presente estudo mostrou que, de maneira geral, respostas a antígenos de estreptococos orais foram mais frequentemente detectadas e de maneira mais intensa no grupo de AT, quando comparado ao de PT, especialmente em T3. Dentro de cada grupo (PT e AT), os padrões de IgA contra antígenos de diferentes espécies estreptocócicas revelaram um aumento na complexidade da resposta destes anticorpos nos primeiros 3 meses de vida.

Estudo recente, realizado com as mesmas crianças, mostrou que os níveis de citocinas IL-6, IL-10, Il-12 e IFN-γ foram maiores e diferentes em PT do que em AT ao nascimento (SESSO *et al*., 2014).

Estudos recentes demonstram que o aleitamento materno pode suprimir esta falta de anticorpos próprios do neonato, já que amostras de colostro apresentam elevados níveis de IgA contra os principais antígenos de SM, especialmente contra GbpB (PETRECHEN *et al*., 2014).

Estudos anteriores, com crianças de 5 a 24 meses de idade, fortemente expostas a *S. mutans*, mostraram um padrão complexo de IgA específica aos seus antígenos (NOGUEIRA *et al.*, 2005, NOGUEIRA *et al.*, 2007), sugerindo que as respostas aos antígenos de virulência, especialmente contra GbpB, cedo na vida, podem influenciar a capacidade destas bactérias em colonizar a cavidade oral. Mais especificamente, a resposta de IgA salivar para GbpB pode modular a infecção por SM.

Nossos resultados sugerem que, embora o sistema imune de mucosas esteja em desenvolvimento, existe produção própria de IgAS do recém nascido, especialmente contra bactérias colonizadores iniciais.

Em resumo, os nossos resultados mostram aumento nos níveis de anticorpos IgA e IgM salivares do nascimento até os 3 meses de vida, em crianças nascidas a termo e pré-termo. A resposta de IgA específica aos antígenos de estreptococos foi complexa e intensa, especialmente para os antígenos de SSA e SMI. Houve várias diferenças nos padrões de resposta de IgA entre os grupos. Embora as crianças AT tenham apresentado uma maior freqüência de resposta positiva para antígenos principalmente em T3, a intensidade da resposta IgA não aumentou entre as visitas. Por outro lado, nos PT, a frequência de crianças com resposta positiva aos antígenos diminuiu, mas a intensidade da resposta aumentou significativamente ao se comparar as amostras colhidas no momento do nascimento (T0) e aos 3 meses de idade (T3). Dessa forma, os padrões de resposta de IgA salivar parecem ser influenciados pela idade gestacional, o que pode refletir o grau de maturidade do sistema imune da mucosa.

Acreditamos ser importante a continuidade da investigação do padrão de resposta imune a microrganismos orais em crianças de baixa faixa etária, já que essa é uma fase ideal para programas de controle de infecção, especialmente contra SM.

O presente estudo permitiu concluir que:

- Níveis totais de IgA e IgM na saliva de crianças nascidas a termo e pré-termo aumentam do nascimento aos 3 meses de idade.

- IgA salivar específica contra diferentes antígenos de estreptococos orais foi mais frequentemente encontrada em crianças a termo do que PT, principalmente aos 3 meses de vida.

-A intensidade da resposta IgA salivar específica contra diferentes antígenos de estreptococos orais aumentou significativamente do nascimento aos 3 meses de vida no grupo de crianças prematuras e não no grupo de crianças a termo.

- A idade gestacional pode influenciar o desenvolvimento da resposta imune mediada por IgA na saliva nos primeiros 3 meses de vida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. P. **Imunologia Celular e Molecular.** 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

AINE, L., BACKSTROM, M. C., MAKI, R., KUUSELA, A. L., KOIVISTO, A. M., IKONEN, R. S., MAKI, M. **Enamel defects in primary and permanent teeth of children born prematurely.** J Oral Pathol Med. 2000; 29: 403-9.

ALVES, A. C, NOGUEIRA, R. D., STIPP, R. N., PAMPOLINI, F., MORAES, A. B. A., GONÇALVES, R. B. *et al.* **Prospective study of potential sources of Streptococcus mutans transmission in nursery school children**. J Med Microbiol. 2009; 58: 476–81.

ARAGÃO, V. M. F. **Fatores de risco para restrição do crescimento intra-uterino: comparação entre duas coortes de duas cidades brasileiras.** Ribeirão Preto, 2003. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP.

BEARFIELD, C., DAVENPORT, E. S., SIVAPATHASUNDARAM, V., ALLAKER, R. P. **Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth**. *BJOG.* 2002; 109 (5): 527-33.

BERKOWITZ, R. J., TURNER, J., GREEN, P. **Primary oral infection of infants with *Streptococcus mutans*.** Archives of Oral Bioloy. 1980; 25: 221-224.

BETTIOL, H., RONA, R. J., CHINN, S., GOLDANI, M., BARBIERI, M. A. **Factors associated with preterm births in Southeast Brazil: a comparison of two birth cohorts born 15 years apart.** Paediatr Perinatal Epidemiol. 2000; 14: 30-8.

BORGES, M. C. L., SESSO, M. L. T., ROBERTI, L. R., OLIVEIRA, M. A. H. M., NOGUEIRA, M. D., GERALDO-MARTINS, V. R., FERRIANI, V. P. L. **Salivary antibody response to streptococci in preterm and fullterm children: A prospective study.** Archives of Oral Biology. 2015; 60: 116-125.

BRANDTZAEG, P. **Overview of the mucosal immune system.** Curr Top Microbiol Immunol. 1989; 146: 13-25.

BRANDTZAEG, P., FARSTAD, I. N., HARALDSEN, G., JAHNSEN, F. L. **Cellular and molecular mechanisms for induction of mucosal immunity.** Dev Biol Stand. 1998; 92: 93-108.

CAMLING, E., KOHLER, B. **Infection with the bacterium Streptococcus mutans and salivary IgA antibodies in mothers and their children.** Arch Oral Biol. 1987; 32: 817-23.

CAPURRO, H., KONICHEZKY, S., FONSECA, D. **A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant**. *J Pediatr.* 1978; 93: 120-122.

CARLSSON, J., GRAHNEN, H., JONSSON, G. **Lactobacilli and streptococci in the mouth of children.** Caries Res. 1975; 9: 333-339.

CAUFIELD, P.W., CUTTER, G.R, DASANAYAKE, A.P. **Initial acquisition of *mutans streptococci* by infants: evidence for a discrete window of infectivity.** J Dent Res. 1993; 72: 37-45.

CAUFIELD, P. W., DASANAYAKE, A. P., LI, Y., PAN, Y., HSU, J., HARDIN, J. M. **Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity.** Infect Immun. 2000; 68: 4018-4023.

CHILDERS, N. K., TONG, G., LI, F., DASANAYAKE, A. P., KIRK, K., MICHALEK, S. M. **Humans immunized with Streptococcus mutans antigens by mucosal routes.** J Dent Res. 2002; 81: 48-52.

CHILDERS, N. K., TONG, G., MITCHELL, S., KIRK, K., RUSSELL, R. W., MICHALEK, S. M. **A controlled clinical study of the effect of nasal immunization with a Streptococcus mutans antigen alone or incorporated into liposomes on induction of immune responses.** Infect Immun. 1999; 67: 618-23.

CHILDERS, N. K., ZHANG, S. S., MICHALEK, S. M. **Oral immunization of humans with dehydrated liposomes containing Streptococcus mutans glucosyltransferase induces salivary immunoglobulin A2 antibody responses.** Oral Microbiol Immunol. 1994; 9: 146-53.

CLAPP, D. W. **Developmental regulation of the immune system.** SeminPerinatol. 2006; 30: 69-72.

COLE, M. F., BRYAN, S., EVANS, M. K., PEARCE, C. L., SHERIDAN, M. J., SURA, P. A. et al. **Humoral immunity to commensal oral bacteria in human infants: salivary secretory immunoglobulin A antibodies reactive with Streptococcus mitis biovar 1, Streptococcus oralis, Streptococcus mutans and Enterococcus faecalis during the first two years of life.** Infect Immun. 1999; 67: 1878-86.

DASANAYAKE, A. P., BOYD, D., MADIANOS, P. N., OFFENBACHER, S., HILLS, E. **The association between *Porphyromonas gingivalis*-specific maternal serum IgG and low birth weight.** J. Periodontol. 2001; 72: 1491-7.

DEMUTH, D. R., DAVIS, C. A., CORNER, A. M., LAMONT, R. J., LEBOY, P. S., MALAMUD, D. **Cloning and expression of a Streptococcus sanguis surface antigen that interacts with a human salivary agglutinin.** Infect Immun. 1988; 56: 2484-2490.

ENDO, T., GOTO, K., ITO, K., SUGIURA, T., TERABE, K., CHO, S., NISHIYAMA, M., SUGIYAMA, K., TOGARI, H. **Detection of congenital cytomegalovirus infection using umbilical cord blood samples in a screening survey**. *J Med Virol.* 2009; 81: 1773-1776.

FADEN, H., DUFFY, L., WILLIAMS, A., KRYSTOFIK, D. A., WOLF, J. **Epidemiology of nasopharyngeal colonization with nontypeable *Haemophilus influenzae* in the first 2 years of life**. J Infect Dis. 1995; 172: 132-5.

FADEN, H., HARABUCHI, Y., HONG, J. J. **Epidemiology of *Moraxella catarrhalis* in children during the first 2 years of life: relationship to otitis media**. J Infect Dis. 1994; 169: 1312-7.

FAVIER, C. F., VAUGHAN, E. E., DE VOS, W. M., AKKERMANS, A. D. **Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates.** *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68: 219-226.

FEARNE, J. M., BRYAN, E. M., ELLIMAN, A. M., BROOK, A. H., WILLIAMS, D. M. **Enamel defects in the primary dentition of children born weighing less than 2000 g**. *Br Dent J*. 1990; 168: 433-7.

FERNANDES; F. R.; NAGAO, A. T.; MAYER, M. P.; ZELANTE, F.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. **Compensatory levels of salivary IgM anti-Streptococcus mutans antibodies in IgA-deficient patients.** J Investig Allergol Clin Immunol. 1995; 5: 151-155.

FITZSIMMONS, S. P.; EVANS, M. K.; PEARCE, C. L.; SHERIDAN, M. J.; WIENTZEN, R.; COLE, M. F. **Immunoglobulin A subclasses in infants saliva and in saliva and milk from their mothers.** J Pediatr. 1994; 124: 566-573.

GLEESON, M., CLANCY, R. L., CRIPPS, A. W., HENRY, R. L., HENSLEY, M. J., WLODARCZYK, J. H. **Acquired IgA deficiency.** Pediatr Allergy Immunol. 1994 ; 5: 157-61.

GLEESON, M., CRIPPS, A. W., CLANCY, R. L. **Modifiers of the human mucosal immune system.** Immun Cell Biol. 1995; 73: 397-404.

GLEESON, M., CRIPPS, A. W., CLANCY, R. L., HENSLEY, M. J., DOBSON, A. J., FIRMAN, D. W. **Breast feeding conditions a differential developmental pattern of mucosal immunity**. Clin Exp Immunol. 1986; 66: 216-222.

HACK, M., TAYLOR, H. G., KLEIN, N., EIBEN, R., SCHATSCHNEIDER, C., MERCURI-MINICH, N. **School-age outcomes in children with birth weights under 750g.** New Engl J Med. 1994; 331: 753-9.

HAJISHENGALLIS, G., MICHALEK, S. M. **Current status of mucosal vaccine against dental caries.** Oral Microbiol Imunol. 1999; 14: 1-20.

HANADA, N., KURAMITSU, H. K. **Isolation and characterization of the Streptococcus mutans gtfC gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans**. Infect Immun. 1988; 56: 1999-2005.

HAYES, J. A., ADAMSON-MACEDO, E. N., PERERA, S., ANDERSON, J. **Detection of secretory immunoglobulin A (SIgA) in saliva of ventilated and non-ventilated preterm neonates.** Neuro Endocrinol Lett. 1999; 20: 109-13.

HILL, G. B. **Preterm birth: associations with genital and possibly oral microflora.** Ann Periodontol. 1998; 3: 222-32.

JESPERSGAARD, C., HAJISHENGALLIS, G., HUANG, Y., RUSSELL, M. W., SMITH, D. J., MICHALEK, S. M. **Protective immunity against Streptococcus mutans infection in mice after intranasal immunization with the glucan-binding region of S. mutans glucosyltransferase.** Infect Immun. 1999; 67: 6543-9.

JIMÉNEZ, E., FERNÁNDEZ, L., MARÍN, M. L., MARTÍN, R., ODRIOZOLA, J. M., NUENO-PALOP, C., NARBAD, A., OLIVARES, M., XAUS, J., RODRÍGUEZ, J. M. **Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section.** *Curr Microbiol.* 2005; 51: 270-274.

JOHRI, A. K., PAOLETTI, L. C., GLASER, P., DUA, M., SHARMA, P. K., GRANDI, G., RAPPUOLI, R. .**Group B streptococcus: global incidence and vaccine development.** Nat. Rev. Microbiol. 2006; 4: 932-942.

JORDAN, H. T., FARLEY, M. M., CRAIG, A., MOHLE-BOETANI, J., HARRISON, L. H., PETIT, S., LYNFIELD, R., THOMAS, A., ZANSKY, S., GERSHMAN, K., ALBANESE, B. A., SCHAFFNER, W., SCHRAG, S. J. **Revisiting the need for vaccine prevention of late-onset neonatal group B streptococcal disease: a multistate, population-based analysis.** Pediatr Infect Dis J. 2008; 27: 1057-1064.

KAUR, K., CHOWDLHURY, S., GREENSPAN, N. S., SCHREIBER, J. R. **Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates.** *Blood.* 2007; 110: 2948-2954.

KLEIN, M. I., FLORIO, F. M., PEREIRA, A. C., HOFLING, J. F., GONÇALVES, R. B. **Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans*and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children.** J Clin Microbiol. 2004; 42: 4620-4626.

KOHLER, B., ANDREEN, I. **Influence of caries-preventive measures in mothers on cariogenic bacteria and caries experience in their children.** Arch Oral Biol. 1994; 39: 907-911.

KRAMER, M. S., DEMISSIE, K., YANG, H., PLATT, R. W., SAUVÉ, R., LISTON, R. **The contribution of mild and moderate preterm birth to infant mortality.** JAMA. 2000; 284: 843-9.

LAI, P. Y., SEOW, W. K., TUDEHOPE, D. I., ROGERS, Y. **Enamel hypoplasia and dental caries in very-low birthweight children: a case-controlled, longitudinal study.** Pediatr Dent. 1997; 19: 42-9

LAW, V., SEOW, W. K. **A longitudinal controlled study of factors associated with mutans streptococci infection and caries lesion initiation in children 21 to 72 months old**. Pediatr Dent. 2006; 28: 58-65.

LI, Y., CAUFIELD, P. W. **The fidelity of initial acquisition of *mutans streptococci* by infants from their mothers.** J Dent Res. 1995; 74: 681-685.

LIU, Y. J., BANCHEREAU, J. **Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells**. Semin Immunol. 1997; 9: 235-40.

LOESCHE, W. J. **Association of the oral flora with important medical diseases.** Curr Opin Periodontol. 1997; 4: 21-8.

LOESCHE, W. J. **Bacterial mediators in periodontal disease.** Clin Infect Dis. 1993; 16: 203-10.

MARCOTTE, H., LAVOIE, M. C. **Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A**. Microbiol Mol Biol Rev. 1998; 62: 71-109.

MARTÍN, R., HEILIG, G. H., ZOETENDAL, E. G., SMIDT, H., RODRÍGUEZ, J. M. **Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut**. *J Appl Microbiol.* 2007; 103: 2638-2644.

MARTÍN, R., LANGA, S., REVIRIEGO, C., JIMÍNEZ, E., MARÍN, M. L., XAUS, J., FERNÁNDEZ, L., RODRÍGUEZ, J. M. **Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut.** *J Pediatr.* 2003; 143: 754-758.

MARUYAMA, K., HIDA, M., KOHGO, T., FUKUNAGA, Y. **Changes in salivary and fecal secretory IgA in infants under different feeding regimens.** Pediatr Int. 2009; 51: 342-345.

MATTOS-GRANER, R. O., CORREA, M. S., LATORRE, M. R., PERES, R. C., MAYER, M. P. ***Mutans streptococci* oral colonization in 12-30-month-old Brazilian children over a one-year follow-up period.** J. Public Health Dent. 2001; 61: 161-167.

MCGAW, T. **Periodontal disease and preterm delivery of low-birth-weight infants.** J Can Dent Assoc. 2002; 68: 165-9.

MCGHEE, J. R., MESTECKY, J., DERTZBAUGH, M. T., ELDRIDGE, J. H., HIRASAWA, M., KIYONO, H. **The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development.** Vaccine. 1992; 10: 75-88.

MELLANDER, L., CARLSSON, B., JALIL, F., SODERSTROM, T., HANSON, L. A. **Secretory IgA antibody response against *Escherichia coli* antigens in infants in relation to exposure.** J Pediatr. 1985; 107: 430-3.

MICHALEK, S. M., KATZ, J., CHILDERS, N. K., MARTIN, M., BALKOVETZ, D. F. **Microbial/host interactions: mechanisms involved in host responses to microbial antigens.** Immunol Res. 2002; 26: 223-234.

MICHETTI, P., MAHAN, M. J., SLAUCH, J. M., MEKALANOS, J. J., NEUTRA, M. R. **Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*.** Infect Immun. 1992; 60: 1786-1792.

MONTEIRO, C. A., D'AQUINO BENICIO, M. H., ORTIZ, L. P. **Tendência secular do peso ao nascer na cidade de São Paulo (1976-1998).** Rev Saúde Pública. 2000; 34: 26-40.

MUSSI-PINHATA, M. M., *et al*. **Infecções neonatais hospitalares**. J Pediatr. 2001; 77: 81-96.

NAGAO, A. T., PILAGALLO, M. I., PEREIRA, A. B. **Quantitation of salivary, urinary and faecal sIgA in children living in different conditions of antigenic exposure**. J Trop Pediatr. 1993; 39: 278-83.

NOGUEIRA, R. D., ALVES, A. C., KING, W. F., GONCALVES, R. B., HÖFLING, J. F., SMITH, D. J., MATTOS-GRANER, R. O. **Age-specific salivary immunoglobulin A response to *Streptococcus mutans* GbpB.** *Clin Vaccine Immunol*. 2007; 14: 804-807.

NOGUEIRA, R. D., ALVES, A. C., NAPIMOGA, M. H., SMITH, D. J., MATTOS-GRANER, R. O. **Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection.** Infect Immun. 2005; 73: 5675-84.

NOGUEIRA, R. D., KING, W. F., GUNDA, G., CULSHAW, S., TAUBMAN, M. A., MATTOS-GRANER, R. O., SMITH, D. J. **Mutans Streptococcal Infection Induces Salivary Antibody To Virulence Proteins And Associated Functional Domains.** Infect immun. 2008; 76: 3606-13.

NOGUEIRA, R. D., SESSO, M. L. T., BORGES, M. C. L., MATTOS-GRANER, R. O., SMITH, D. J., FERRIANI, V. P. L**. Salivary IgA antibody responses to *Streptococcus mitis* and *Streptococcus mutans* in preterm and fullterm newborn children**. *Arch Oral Biol.* 2012; 57: 647-653.

NONOYAMA, S., PENIX, L. A., EDWARDS, C. P., LEWIS, D. B., ITO, S., ARUFFO, A., et al. **Diminished expression of CD40 ligand by activated neonatal T cells.** *J Clin Invest.* 1995; 95: 66-75.

OFFENBACHER, S., KATZ, V., FERTIK, G., COLLINS, J., BOYD, D., MAYNOR, G., MCKAIG, R., BECK, J. **Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight.** J Periodontol. 1996; 67: 1103-13.

PEARCE, C., BOWDEN, G. H., EVANS, M., FITZSIMMONS, S. P., JOHNSON, J., SHERIDAN, M. J., WIENTZEN, R., COLE, M. F. **Identification of pioneer *viridans streptococci* in the oral cavity of human neonates.** J Med Microbiol. 1995; 42: 67-72.

PETRECHEN, L. N., ZAGO, F. H., SESSO, M. L. T., BERTOLDO, B. B., SILVA, C. B., AZEVEDO, K. P., LIMA PEREIRA, S. A., GERALDO-MARTINS, V. R., FERRIANI, V. P. L., NOGUEIRA, R. D. **Levels and complexity of IgA antibody against oral bacteria in samples of human colostrums**. Immunobiology. 2015; 220: 142-146.

POULSEN, K., REINHOLDT, J., JESPERSGAARD, C., BOYE, K., BROWN, T. A., HAUGE, M., KILIAN, M. A. **Comprehensive genetic study of streptococcal immunoglobulin A1 proteases: evidence for recombination within and between species.** *Infect Immun.* 1998; 66: 181-190.

PULVER, L. S., HOPFENBECK, M. M., YOUNG, P. C., STODDARD, G. J., KORGENSKI, K., DALY, J., BYINGTON, C. L. **Continued early onset group B streptococcal infections in the era of intrapartum prophylaxis.** J Perinatol. 2009; 29: 20-25.

ROMBALDI, R. L., SERAFINI, E. P., MANDELLI, J., ZIMMERMANN, E., LOSQUIAVO, K. P. **Perinatal transmission of human papilomavirus DNA**. Virol J. 2009; 21: 83–6.

RUSSELL, M. W., HAJISHENGALLIS, G., CHILDERS, N. K., MICHALEK, S.M. **Secretory immunity in defense against cariogenic *mutans streptococci*.** Caries Res. 1999; 33: 4-15.

SADEGHI, K., BERGER, A., LANGGARTNER, M., PRUSA, A.R., HAYDE, M., HERKNER, K., POLLAK, A., SPITTLER, A., FORSTER-WALDL, E. **Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling.** J Infect Dis. 2007; 195: 296-302.

SAIGAL, S., HOULT, L. A., STREINER, D. L., STOSKOPF, B. L., ROSENBOUM, P. L. **School difficulties at adolescence in a regional cohort of children who were extremely low birth weight.** Pediatrics. 2000; 105: 325- 31.

SEIDEL, B. M., SCHULZE, B., KIESS, W., VOGTMANN. C., BORTE, M. **Determination of secretory IgA and albumin in saliva of newborn infants.** Biol Neonate. 2000; 78: 186-90.

SEOW, W. K. **Effects of preterm birth on oral growth and development**. Aust Dent J. 1997; 42: 85-91.

SEOW, W. K. **A study of the development of the permanent dentition in very low birthweight children**. Pediatr Dent. 1996; 18: 379-84.

SILVA, A. A., COIMBRA, L. C., DA SILVA, R. A., ALVES, M. T., LAMY FILHO, F., CARVALHO LAMY, Z., GOMIDE MOCHEL E., ARAGAO, V. M., RIBEIRO, V. S., TONIAL, S. R., BARBIERI, M. A. **Perinatal health and mother-child health care in the municipality of São Luís, Maranhão State, Brazil.** Cad Saúde Pública. 2001; 17: 1413-23.

SMITH, D. J., HESCHEL, R. L., MELVIN, J., KING, W. F., PERIERA, M. B. B., TAUBMAN, M. A. **Streptococcus mutans glucan binding proteins as dental caries vaccines**. 1997; 2: 367–377.

SMITH; D. J., KING, W. F., AKITA, H., TAUBMAN, M. A. **Association of salivary immunoglobulin A antibody and initial *mutans streptococcal* infection.** Oral Microbiol Immunol. 1998; 13: 278-285.

SMITH, D. J., KING, W. F., BARNES, L. A., PEACOCK, Z., TAUBMAN, M. A. **Immunogenicity and protective immunity induced by synthetic peptides associated with putative immunodominant regions of Streptococcus mutans glucan-binding protein B.** Infect Immun. 2003; 71: 1179-84.

SMITH, D.J., KING, W.F., TAUBMAN, M.A. **Isotype, subclass and molecular size of immunoglobulins in salivas from young infants.** Clin Exp Immunol. 1989; 76: 97-102.

SMITH, D. J., SHOUSHTARI, B., HESCHEL, R. L., KING, W. F., TAUBMAN, M. A. **Immunogenicity and protective immunity induced by synthetic peptides associated**

with a catalytic subdomain of mutans group streptococcal glucosyltransferase. Infect Immun 1997; 65: 4424-30.

SMITH, D. J., TAUBMAN, M.A. **Effect of local deposition of antigen on salivary immune responses and reaccumulation of *mutans streptococci*.** J Clin Immunol. 1990; 10: 273-281.

SMITH, D. J., TAUBMAN, M. A. **Experimental immunization of rats with a Streptococcus mutans 59-kilodalton glucan-binding protein protects against dental caries.** Infect Immun. 1996; 64: 3069-73.

SMITH, D. J., TAUBMAN, M. A. **Ontogeny of immunity to oral microbiota in humans.** Crit Rev Oral Biol Med. 1992; 3: 109-33.

SOCRANSKY, S. S., SMITH, C., MARTIN, L., PASTER, B. J., DEWHIRST, F. E., LEVIN, A. E. **'*Checkerboard*' DNA-DNA *hybridization*.** *Biotechniques.* 1994; 17: 788–792.

TANNER, A. C., MILGROM, P. M., KENT, R. J. R., MOKEEM, S. A., PAGE, R. C., LIAO, S. I., RIEDY, C. A., BRUSS, J. B. **Similarity of the oral microbiota of pre-school children with that of their caregivers in a population-based study**. Oral Microbiol Immunol. 2002; 17: 379-387.

TANZER, J. M., LIVINGSTON, J., THOMPSON, A. M. **The microbiology of primary dental caries in humans.** J Dent Educ. 2001; 65: 1028-1037.

TANZER J. M., THOMPSON A. M., GRANT L. P., VICKERMAN M. M., SCANNAPIECO F. A. ***Streptococcus gordonii*'s sequenced strain CH1 glucosyltransferase determines persistent but not initial colonization of teeth of rats.** *Arch Oral Biol.* 2008; 53: 133-140.

TAPPUNI, A. R., CHALLACOMBE, S. J. **Distribution and isolation frequency of eight streptococcal species in saliva from predentate and dentate children and adults.** J Dent Res. 1993; 72: 31-36.

THRANE, P. S., ROGNUM, T. O., HUITFELDT, H. S., BRANDTZAEG, P. **The distribution of HLA-DR determinants; secretory component (SC), amylase, lysozyme, IgA, IgM and IgD in fetal and postnatal salivary glands.** Adv Exp Med Biol. 1987; 216:1431-1438.

VACCA-SMITH, A. M., JONES, C. A., LEVINE, M. J., STINSON, M. W. **Glucosyltransferase mediates adhesion of *Streptococcus gordonii* to human endothelial cells in vitro.** *Infect Immun.* 1994; 62: 2187-2194.

VACCA-SMITH, A. M., NG-EVANS, L., WUNDER, D., BOWEN, W. H. **Studies concerning the glucosyltransferase of *Streptococcus sanguis***. *Caries Res.* 2000; 34: 295-302.

VAN NIEUW AMERONGEN, A., BOLSCHER, J. G., VEERMAN, E. C. **Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology?** Caries Res. 2004; 38: 247-53.

WAN, A. K., SEOW, W. K., PURDIE, D. M., BIRD, P. S., WALSH, L. J., TUDEHOPE, D. I. **Immunoglobulins in saliva of preterm and full-term infants. A longitudinal study from 0-18 months of age.** *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 72-78.

XIMENEZ-FYVIE, L. A., HAFFAJEE, A. D., SOCRANSKY, S. S. **Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis.** J Clin Periodontol. 2000;27: 722-32.

YAMANAKA, N., FADEN, H. **Antibody response to outer membrane protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* in otitis-prone children**. J Pediatr. 1993;122:212-8

ANEXOS

ANEXO 1 (Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP/USP)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

USP - RIBEIRÃO
assistência - ensino - pesquisa

Ribeirão Preto, 29 de agosto de 2007

Ofício nº 2963/2007
CEP/SPC

Prezada Senhora,

O trabalho intitulado **"RESPOSTA IMUNE DE MUCOSAS EM NASCIDOS PRÉ-TERMO (PT) E DE BAIXO PESO AO NASCER (BPN)",** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 253ª Reunião Ordinária realizada em 27/08/2007, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido,** de acordo com o Processo HCRP nº 4105/2007.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
RUCHELE DIAS NOGUEIRA
PROFª DRª VIRGÍNIA PAES LEME FERRIANI (Orientadora)
Depto. de Puericultura e Pediatria

Comitê de Ética em Pesquisa HC e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO 2 (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aplicado as mães antes da coleta de saliva)

Termo de informação e consentimento para a participação em pesquisa clínica

Título: CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE MUCOSAS A COLONIZADORES INICIAIS DA CAVIDADE BUCAL: INFLUÊNCIA DA PREMATURIDADE

Pesquisadores:

Mariana Castro Loureiro Borges e Curi
Dra. Ruchele Dias Nogueira
Dra Virgínia Paes Leme Ferriani
Endereço: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP
Departamento de Puericultura e Pediatria

Este termo contém as informações sobre a pesquisa na qual você e seu (ua) filho (a) poderão participar. **Por favor, leia-o atentamente**. Qualquer dúvida que tiver, esclareça-a com a pesquisadora responsável, a qual estará a sua inteira disposição. Você deve decidir se deseja ou não participar desta pesquisa após entender todos os aspectos descritos a seguir, de modo que possa tomar uma decisão consciente.

1) Objetivo:
Esta pesquisa tem como objetivo analisar a cavidade oral de crianças nascidas a termo e prematuras, através da coleta de saliva estimulada, com a qual iremos analisar a colonização bacteriana da mucosa oral dessas crianças. Este estudo pretende identificar possíveis fatores bacterianos e imunológicos relacionados com a capacidade destes microrganismos de se estabelecer na boca, inclusive o *Streptococcus mutans* que é o principal microrganismo envolvido com cárie dentária. E ainda, analisar possíveis deficiências de desenvolvimento de anticorpos na boca de bebês prematuros.

2) Justificativas:
Os anticorpos presentes nas salivas representam uma importante defesa do organismo contra bactérias que adentram a boca. Os bebês, logo após o nascimento, apresentam poucos anticorpos ou mesmo anticorpos despreparados para eliminar estes microrganismos invasores. Crianças nascidas prematuramente parecem apresentar deficiências de anticorpos maiores que bebês nascidos em tempo certo, daí a necessidade de maiores estudos envolvendo estes bebês (prematuros) para que se consiga um perfeito entendimento e possíveis medidas preventivas para controle de infecções.
A cárie dental é uma doença infecciosa, cujo tratamento dos sintomas através de restauração do dente cariado é extremamente caro. A maior parte dos recursos públicos e privados ainda é aplicada em procedimentos curativo-restauradores e pouca ênfase é dada ao avanço de estratégias preventivas de controle desta doença. *Streptococcus mutans* é uma bactéria que adentra a boca e é a principal responsável pelo desenvolvimento da cárie

dental. Procura-se também avaliar a capacidade de defesa das crianças logo ao nascimento e aos 3 meses de vida contra estas bactérias durante os processos de infecção. Assim, teremos maiores dados para o desenvolvimento de estratégias de controle de infecção que possam ser aplicados em programas de saúde pública.

3)Descrição da pesquisa:
Participarão deste trabalho 200 crianças com idade inicial de 0 dias, as quais serão acompanhadas até atingirem 3 meses de idade. A criança será submetida à coleta de saliva com uma pipeta plástica descartável e esterilizada. Este material será utilizado nesta pesquisa ou em pesquisas futuras relacionadas. As mães das crianças participantes também serão entrevistadas para a obtenção de informações adicionais sobre seus (uas) filhos (as).

4) Desconfortos, riscos e benefícios esperados:
As crianças que participarem da pesquisa serão examinadas e terão as salivas não estimuladas, coletadas com pipetas que serão introduzidas na região da boca, sugando uma pequena quantidade de saliva, procedimento este que causa mínimo desconforto. Não existem riscos adicionais. As mães serão entrevistadas pela pesquisadora responsável nas maternidades em que o parto foi realizado. Os benefícios serão os conhecimentos gerados por esta pesquisa e o diagnóstico precoce de possíveis problemas bucais e de saúde geral, o qual será transmitido às mães e agentes de saúde.

5) Alternativas:
Não existem métodos alternativos para a obtenção das informações necessárias.

6) Exclusões:
Serão excluídas das pesquisas, as crianças com problemas de saúde geral ou sob antibiótico terapia até três semanas antes do dia do exame.

7) Compensação:
Não há previsão de indenização ou ressarcimento, pois não existirão gastos ou riscos relacionados exclusivamente com a pesquisa.

8) Confidencialidade dos registros:
Você e seu filho terão direito à privacidade, visto que todas as informações obtidas dos prontuários clínicos e laboratoriais permanecerão confidenciais nos âmbitos possíveis da lei, assegurando a proteção da sua imagem. Serão respeitados seus valores culturais, sociais, morais, religiosos e éticos. A menos que a revelação seja exigida por ação legal ou regulatória, todos os esforços serão feitos para protegê-los, a você e a seu (ua) filho (a), de serem identificados pessoalmente. Como participante desta pesquisa, você terá acesso aos resultados obtidos e permitirá o acesso dos mesmos aos pesquisadores envolvidos e aos membros da comissão de ética responsável. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em congressos ou publicados em revistas científicas, porém sua identidade não será divulgada.

9) Direito de participar, recusar ou sair:
Sua participação é voluntária e você poderá recusar-se a participar ou mesmo interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perdas de seus benefícios aos quais de outra forma tenha direito. Os pesquisadores terão o direito de desligá-lo do estudo a qualquer momento, se julgarem necessário. Ao participar, você concorda em cooperar

com a pesquisa, não abrindo mão de seus direitos legais ao assinar o termo de consentimento informado.

10) Contatos:

Quaisquer dúvidas poderão ser esclarecidas com o pesquisador responsável, Dra. Ruchele Dias Nogueira e Doutoranda Mariana Castro Loureiro Borges e Curi, no laboratório do Departamento de Puericultura e Pediatria, bloco G, 1° andar, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Tendo compreendido o termo de informação e consentimento para a participação da pesquisa clínica intitulada "**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE MUCOSAS A COLONIZADORES INICIAIS DA CAVIDADE BUCAL: INFLUÊNCIA DA PREMATURIDADE"**, autorizo a participação de meu (minha) filho (a), _____, bem como concordo em participar deste estudo. Sei que nossa participação é voluntária e que posso interrompê-la a qualquer momento sem penalidades. Autorizo a utilização dos dados obtidos pelos pesquisadores envolvidos para a publicação em revistas científicas e apresentação em congressos.

Recebi uma cópia do termo de consentimento.

(Não assine este termo caso não tenha tido oportunidade de esclarecer suas dúvidas ou não tenha recebido respostas satisfatórias a todas elas).

Ribeirão Preto, _____ de _____de _____.

Nome da mãe: _____

RG:_____

Assinatura: _____

_____	_____
Mariana Castro Loureiro Borges e Curi	Dra. Virgínia Paes Leme Ferriani
Doutoranda	Orientadora

ANEXO 3 (Artigo publicado em revista científica no ano de 2012)

ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY 57 (2012) 647–653

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/aob

Salivary IgA antibody responses to *Streptococcus mitis* and *Streptococcus mutans* in preterm and fullterm newborn children

Ruchele Dias Nogueira [a,b,*], *Maria Lucia Talarico Sesso* [b], *Mariana Castro Loureiro Borges* [b], *Renata O. Mattos-Graner* [c], *Daniel James Smith* [d], *Virginia Paes Leme Ferriani* [b]

[a] *University of Uberaba, Minas Gerais, Brazil*
[b] *Department of Pediatrics, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil*
[c] *Department of Microbiology and Immunology, Piracicaba School of Dentistry, University of Campinas, Sao Paulo, Brazil*
[d] *Department of Immunology, The Forsyth Institute, MA, United States*

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 7 November 2011

Keywords:
Streptococcus mutans
Streptococcus mitis
IgA
Saliva
Prematurity

ABSTRACT

Objectives: The intensities and specificities of salivary IgA antibody responses to antigens of *Streptococcus mutans*, the main pathogen of dental caries, may influence colonization by these organisms during the first 1.5 year of life. Thus, the ontogeny of salivary IgA responses to oral colonizers continues to warrant investigation, especially with regard to the influence of birth conditions, e.g. prematurity, on the ability of children to efficiently respond to oral microorganisms. In this study, we characterised the salivary antibody responses to two bacterial species which are prototypes of pioneer and pathogenic microorganisms of the oral cavity (*Streptococcus mitis* and *Streptococcus mutans*, respectively) in fullterm (FT) and preterm (PT) newborn children.

Methods: Salivas from 123 infants (70 FT and 53 PT) were collected during the first 10 h after birth and levels of IgA and IgM antibodies and the presence of *S. mutans* and *S. mitis* were analysed respectively by ELISA and by chequerboard DNA–DNA hybridization. Two subgroups of 24 FT and 24 PT children were compared with respect to patterns of antibody specificities against *S. mutans* and *S. mitis* antigens, using Western blot assays. Cross-adsorption of 10 infant's saliva was tested to *S. mitis*, *S. mutans* and *Enterococcus faecalis* antigens.

Results: Salivary levels of IgA at birth were 2.5-fold higher in FT than in PT children (Mann–Whitney; $P < 0.05$). Salivary IgA antibodies reactive with several antigens of *S. mitis* and *S. mutans* were detected at birth in children with undetectable levels of those bacteria. Adsorption of infant saliva with cells of *S. mutans* produced a reduction of antibodies recognizing *S. mitis* antigens in half of the neonates. The diversity and intensity of IgA responses were lower in PT compared to FT children, although those differences were not significant.

Conclusion: These data provide evidence that children have salivary IgA antibodies shortly after birth, which might influence the establishment of the oral microbiota, and that the levels of salivary antibody might be related to prematurity.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* *Corresponding author at:* Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto, Departamento de Puericultura e Pediatria, Av. dos Bandeirantes, 3900, CEP 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil. Tel.: +55 16 3602 2902; fax: +55 16 3602 2297.
E-mail address: ruchele_nogueira@yahoo.com.br (R.D. Nogueira).
0003–9969/$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.archoralbio.2011.11.011

1. Introduction

The mucosal immune system represents the first line of defence in the adaptive immune response to mucosal infection. Secretory IgA (SIgA) present in saliva[1] may control the oral microbiota by reducing the adherence of bacteria to the oral mucosa and teeth.[2] The total levels of SIgA in saliva have been considered as an indicator of maturation of the mucosal immune system in children.[3–6] Transient reductions in the levels of IgA detected in saliva were associated with increased susceptibility to infections of the gastrointestinal tract.[4,6] Several factors might influence the development of an effective mucosal immune response, including nutritional status, breastfeeding, gestational age, exposition to antigens and genetic factors.[7] Newborn infants are known to have a higher frequency of microbial infections than older children and adults soon after birth, due to immaturity of the immune system.[8] Babies born prematurely (less than 37 weeks gestation) have 5 times higher susceptibility to bacterial infections.[9] Streptococci such as *S. mitis* represent the majority of bacteria that initially colonize the oral cavity.[10–12] After tooth eruption new species colonize such as *S. mutans*,[5,13] although such species can be also detected in children before tooth eruption.[14] Prospective study of 5- to 24-month-old children heavily exposed to *S. mutans* showed a complex pattern of salivary IgA antibody reactivity to antigens from *S. mutans* and *S. mitis*,[15,16] suggesting that responses to virulence-associated antigens early in life may influence the ability of *S. mutans* to colonize the oral cavity. Several recent studies showed that SIgA is present in saliva and other secretions at birth.[6,7] However, the influence of these antibodies in the establishment of the oral microbiota is unknown.

In this study, we characterised the levels and specificities of salivary IgA antibodies to *S. mitis* and *S. mutans* antigens in newborn children, and compared intensities and complexities of antibody responses between fullterm (FT) and preterm (PT) children.

2. Materials and methods

2.1. Study design

A total of 123 (70 FT and 53 PT) newborn children in the Hospital of the University of Ribeirao Preto, Brazil were enrolled in this study, under mothers consent for their participation. This study was approved by the Ethical Committee of the Medical School of Ribeirao Preto, SP, Brazil, 2963/2007. To be included in the study population, only healthy newborns less than 10 h old were included in this study. Children with congenital malformations, perinatal hypoxia, intracranial haemorrhage, with length or weight incompatible with gestational ages, or under antibiotic therapy were excluded from this study. Gestational age was estimated from the reported date of last menstruation period and somatic evaluation. Information on maternal and gestational background was obtained by interviewing the mother. A total of 123 children, 70 FT and 53 PT were born at mean gestational ages of 39.2 (SD: 1.23, range: 37–41) and 34.5 (SD: 2.21, range: 30–36.5) weeks respectively. Forty-one (18 PT and 23 FT) and 82 (35 PT and 47 FT) infants were delivered by caesarean and vaginally section respectively. Amongst those children ($n = 123$) from whom volumes of saliva collected were suitable for laboratory analysis, two subsets of children were selected for immunological analysis: 24 PT (<37 weeks of gestation) and 24 FT children. For the purposes of comparison, these PT and FT children were paired based on total salivary levels of IgA, gender, racial background and breastfeeding.

2.2. Collection of samples

Samples of whole saliva unstimulated were collected using sterile polypropylene transfer pipettes. Collections were performed in all children at approximately 4–10 h after birth in order to standardize the collection and the oral microbial exposure, and at least 3 h after breastfeeding to avoid contamination with non-salivary components, but in four children (3 FT and 1 PT) saliva samples were collected before the first breastfeeding. Solution of 250 mM EDTA, pH 5.2 (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added to each sample prior to transport on ice to the laboratory where they were stored at −80 °C until analysis. Samples of colostrum and maternal milk were collected by manual expression into empty sterile containers on the 1st day of lactation from 20 puerperal mothers of the some children in the study. After collection, the maternal samples also were transported on ice to the laboratory, centrifuged to remove lipids components and stored at −80 °C until use.

2.3. Detection of Streptococcal species in the oral cavity

The presence of *S. mutans* and *S. mitis* in the samples of saliva of newborn children was investigated by chequerboard DNA–DNA hybridization with species-specific probes as described by Socransky et al.[17] Briefly, 0.5 M NaOH, pH 13.4 (Sigma) was added to saliva samples. After boiling, samples were applied and fixed by exposure to ultra-violet light (Hybrilinker, UVP, Upland, CA, USA) in individual lanes on a nylon membrane (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) using the chequerboard slot blot device (Minislot 30, Immunetics, Cambridge, MA, USA). Digoxigenin-labelled whole genomic DNA probes were prepared for each one of the reference strains (*S. mutans* [UA159] and *S. mitis* [ATCC506]) using a random primer technique. These two DNA probes were hybridized perpendicularly to the lanes of the bacterial samples using the Miniblotter 45 (Immunetics Cambridge, MA, USA) at 70 °C. Bound probes were detected using phosphatase-conjugated antibody to digoxigenin (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) and revealed with CDP-Star® (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). Two lanes in each run contained standards at concentrations of 10^5 and 10^6 cells of each species. The sensitivity of the assay was adjusted to permit detection of 10^4 cells of a given species by adjusting the concentration of each DNA probe. The signals developed on X-ray films were scanned in a densitometer (Bio-Rad GS-700 Imaging Densitometer, Hercules, CA, USA) and evaluated using the ImageQuant Software (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). Signals were converted to absolute counts by comparison

with the standards on the same membrane. Failure to detect a signal was recorded as zero.

2.4. Concentration of protein, IgA and IgM

Total concentration of protein in saliva was determined by the method of Bradford (Sigma) to check for variations in salivary flow. Total levels of IgA and IgM were determined in capture ELISA assays as previously described.[15]

2.5. Salivary and maternal milk IgA reactivity against bacterial antigens

Patterns of reactivity of salivary IgA and breast milk antibody against *S. mitis* (ATCC 906) and *S. mutans* (UA 159) Ags were determined in Western blot assays. Sixteen micrograms of antigen extracts prepared as previously described[15] were loaded per lane, separated by sodium dodecyl sulphate–6% polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred to nitrocellulose membranes. After being stained with Red Ponceau (Sigma), membranes were washed and blocked overnight at 4 °C (in Tris-buffered saline–Tween, pH 7.5, 5% nonfat milk). Incubations with samples diluted 1:100 were performed at room temperature for 2 h. As negative controls, membranes were incubated only with blocking buffer, and as positive controls, membranes were incubated with a standard saliva sample obtained from an adult whose pattern of reaction with *S. mutans* and *S. mitis* antigen extracts had been previously measured. The secondary antibody was goat IgG anti-human IgA conjugated with horseradish peroxidase (1:4000 dilution). Antibody reactions were developed using an ECL system (Amersham Biosciences). For this purpose, immunoblots were incubated with ECL detection solution and then exposed to the same X-ray film for 5 min. The developed X-ray films were scanned in a scanning densitometer (Bio-Rad GS-700 Imaging Densitometer) to analyse patterns of antigen recognition, including the number and intensity of reactive bands. A film blank value was subtracted from the value of the reactive band.

In order to determine whether any of the antibodies detected were uniquely specific for a single species, ten saliva samples (3 PT and 7 FT) were adsorbed sequentially with antigens of cells of *S. mitis*, *S. mutans* and *Enterococcus faecalis* as described by Cole et al.[18] Antibody activities remaining after adsorption (percent) were determined by dividing the optical density at 450 nm of each adsorbed saliva by that of the corresponding unabsorbed saliva at the same dilution and multiplying by 100.

2.6. Statistical analysis

Associations between concentrations of IgA, IgM and total protein, and patterns of antibody reactions were tested by Spearman correlation analysis. Differences in the densitometry values of reactive Ags between the subsets of PT and FT children were analysed by a Mann–Whitney U test. Comparisons of the frequencies of children with distinct IgA antibody specificities were tested by a chi-square test. A P-value of < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Levels of IgA and IgM

Immunoglobulin A and IgM were detected in all saliva samples tested ($n = 123$). There were statistically significant differences

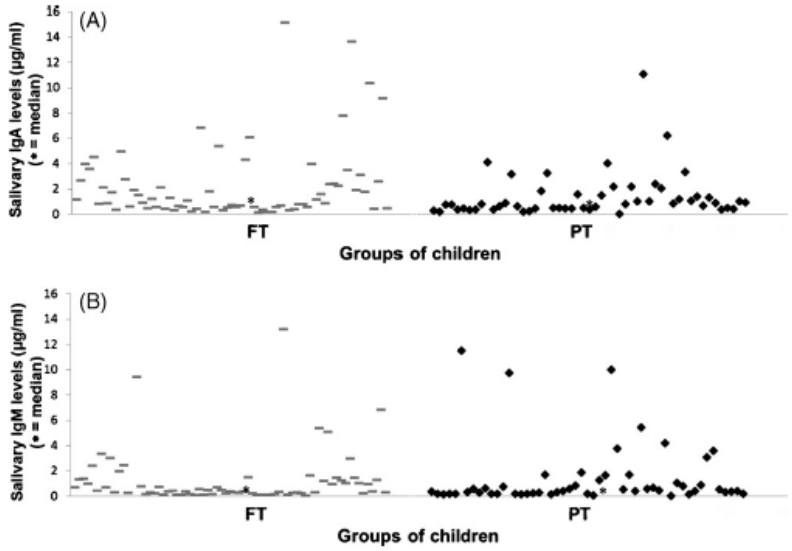


Fig. 1 – Levels of salivary IgA (A) and IgM (B) observed amongst 123 children, Preterm (PT) and Fullterm (FT) measured in the same samples. Squares represent absolutes amounts of immunoglobulins in salivas (µg/ml). Asterisks represent the median levels of Ig in each group of children.

in levels of salivary IgA between PT (median: 0.78, interquartile range [IQR]: 0.43–1.49) and FT (median: 1.09, IQR: 0.55–2.75) (Mann–Whitney U test, $P < 0.05$). A positive correlation was observed between salivary levels of IgA and IgM in each group (Spearman's, $r > 0.75$, $P < 0.01$). Fluctuation of absolute levels of IgA (A) and IgM (B) are shown in Fig. 1. The median concentration of total protein in saliva was 834.3 μg/ml (IQR: 613.9–1219.4), with similar levels in FT and PT infants (Mann–Whitney, $P > 0.05$). The median ratios of values of IgA normalized by protein concentration (median ratio, 0.10, IQR: 0.05–0.20) determined for PT was significantly lower than that observed in FT infants (median ratio, 0.22, IQR: 0.06–0.40; Mann–Whitney; $P < 0.05$). No significant differences were detected in median ratios of values of IgM normalized by protein concentration between groups (PT = median ratio, 0.08, IQR: 0.02–0.15 vs FT = median ratio, 0.10, IQR: 0.02–0.20, Mann–Whitney; $P > 0.05$). The median concentration of total IgA in maternal milk was 2567.8 μg/ml (IQR: 834.0–3986.3) not differing between mothers of preterm and full-term infants (Mann–Whitney, $P > 0.05$). Also, the levels of immunoglobulins and proteins were similar in infants delivered by caesarean section or vaginally (Mann–Whitney; $P > 0.05$).

3.2. *Complexity and intensity of IgA response to S. mutans and S. mitis Ags*

Detection of streptococci in oral samples using chequerboard DNA–DNA hybridization assays showed that no children have *S. mitis* or *S. mutans* in saliva samples at the levels tested. Fifty and 37.5% of PT ($n = 12$) and FT ($n = 9$) respectively did not show IgA-reactive bands to the antigen extracts tested. However, amongst the IgA-reactive children, several bands of IgA reactivity with *S. mutans* and *S. mitis* antigens were identified, especially in FT children. Examples of immunoblots incubated with salivas from three representative pairs of PT and FT children against Ags from *S. mutans* and *S. mitis* are shown in Fig. 2A. Maternal and child patterns of IgA-reactivity with *S. mitis* and *S. mutans* antigens were compared. Interestingly, few coincident bands were noted between mother and child. Median percentage values of coincident bands to total number of bands identified were 5 and 8% for *S. mitis* and *S. mutans*, respectively. Three pairs of examples of immunoblots comparing the mother milk and her baby's saliva are shown in Fig. 2B. In addition, the immunoblots from two children (1 PT and 1 FT) who were not yet breast fed presented IgA response to antigens from *S. mutans* and *S. mitis* (Fig. 2A, pair 10).

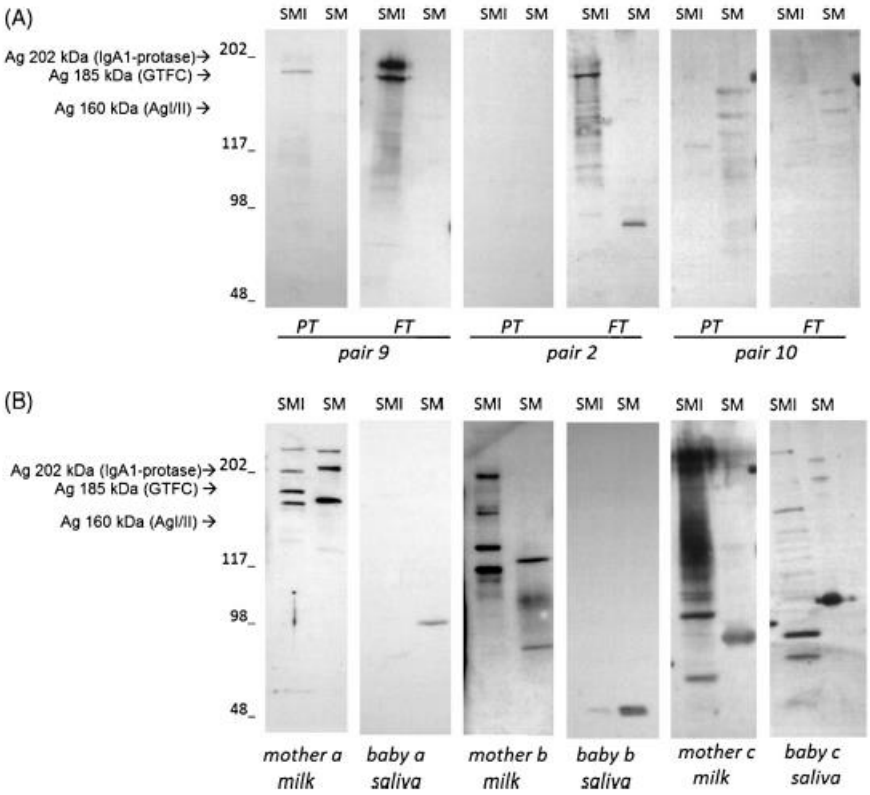


Fig. 2 – (A–B) Patterns of IgA specificities against antigens from *S. mitis* (SMI) and *S. mutans* (SM) in 3 pairs (A) of preterm (PT) and fullterm (FT) children's salivas. Standard molecular sizes (kDa) and specific antigens (202, 185 and 160 kDa) are indicated on the left side of the immunoblots. (B) Comparison of complexity of IgA antibody reactivities between 2 samples of milk's mother and their respective babýs salivas.

Table 1 – Comparisons of the frequencies of children with positive salivary IgA responses and sum of mean intensities to total and specific Ags from *Streptococcus mitis* (SMI) and *Streptococcus mutans* (SM) between preterm (PT) and fullterm (FT) groups.

Antigens	Number (%) of children with salivary IgA reactive		Sum of mean Intensity of salivary IgA reactive ±SD	
	PT $n = 24$	FT $n = 24$	PT $n = 24$	FT $n = 24$
Streptococcus mitis				
Total SMI Ags	11(46)	12(50)	296 ± 575	10201 ± 29482
202 kDa Ags (IgA1-protease)	3(13)	7(29)	85 ± 244	107 ± 226
Mean number of reactive Ags ± SD	1.0 ± 1.5[a]	2.7 ± 4.1[a]		
Streptococcus mutans				
Total SM Ags	7(29)	11(46)	215 ± 567	466 ± 896
160 kDa Ags (GTF C)	2(8)	6(25)	16 ± 53	47 ± 125
185 kDa Ags (Ag I/II)	4(17)	4(17)	21 ± 88	46 ± 104
Mean number of reactive Ags ± SD	0.9 ± 1.6	1.5 ± 2.0		

[a] Significant differences between PT and FT groups; Mann–Whitney U test: $P \leq 0.05$.

Antigens in both species are shown to react with salivary IgA in both pairs. Taken together, these data suggest that the IgA reactivities seen in the children's salivas are derived, at least in part, from the child.

The numbers of children that presented detectable IgA antibodies to antigens of each *Streptococcal* species and mean numbers of reactive bands detected are shown in Table 1. Although IgA antibody responses were detected more frequently to *S. mitis* Ags ($n = 23$, [11 PT and 12 FT]) when compared to *S. mutans* antigens ($n = 18$, [7 PT and 11 FT]) those differences were not significant (Mann–Whitney, $P > 0.05$). Additionally, the number of IgA-reactive bands to *S. mitis* antigens was significantly higher in FT than in PT children (Mann–Whitney U test, $P \leq 0.05$). Six percent of the SDS–PAGE gels analysed allowed the visualization of important antigens from *S. mutans*: Ag I/II (185 kDa), GTF C (160 kDa) and GbpB (56 kDa) and of *S. mitis*: IgA-protease (202 kDa). Twenty-one percent of children ($n = 10$, [3PT and 7FT]) had IgA reactive to Ag 202 kDa–*S. mitis* and 16.5 ($n = 8$, [2PT and 6FT]) and 17 ($n = 8$ [4FT and 4 PT]) % of children presented IgA reactive to 185 and 160 kDa–*S. mutans* Ags respectively (Table 1). We did not find children with IgA reactive with bands in the 56 kDa region of *S. mutans* blots. There were no significant differences in the number of PT and FT children with IgA responses to these antigens (Qui Square test, $q < 2.01$; $P > 0.27$).

There were variations in the intensities and numbers of IgA antibody reactions with the recognized bands amongst children in both groups. Table 1 shows the sums of intensities of IgA reactions with all bands detected for each species (total intensities) observed in children of the FT and PT groups. In general, FT children presented the highest intensity of IgA to all antigens tested but those differences were not statistically significant (Mann–Whitney U test, $P > 0.2$), likely due to the high variability in intensities of response amongst children of each group.

The results showed that SIgA antibody from 10 samples (3 PT and 7 FT) tested did not react with *E. faecalis* antigens, as SIgA responses to *S. mutans* and *S. mitis* were not reduced by *E. faecalis* cross-adsorption. On the other hand, when samples ($n = 10$) were adsorbed with cells of *S. mitis*, there were mean reductions of 22% of SIgA to *S. mutans* in 5 children (4 FT and 1 PT). In the same children ($n = 5$), there was also a mean reduction of 45% of SIgA to *S. mitis* when samples were adsorbed previously with cells of *S. mutans*.

4. Discussion

Salivary IgA antibodies play several roles in the modulation of the establishment of the microbiota compatible with health homeostasis[19] and form a first line of defence against specific pathogens.[19] Salivary IgA antibodies neutralize antigenic components involved in microbial virulence and might block surface adhesins important for colonization of the mucosa.[20] In the saliva, secretory IgA predominates, but early in life, IgM is also normally detected.[6] Previously, it was described that IgA can be detected in saliva at birth.[6,7] Here we show that detectable levels of salivary IgA antibodies reactive with common bacterial species of the oral cavity can be detected in the first hours of life.

With respect to gestational age, not only were the total levels of salivary IgA higher in FT (up to 2.5-fold) but also the complexity of IgA against bacterial species (Fig. 2A, Table 1), suggesting that prematurity can lead to a delay in IgA responses at initial stages of antigenic challenge. Longitudinal comparisons of levels of IgA in PT and FT infants could be helpful to clarify the extent to which this difference is maintained over time.

Previously, we suggested that patterns of specificity of IgA antibody responses to *S. mutans* antigens might be more important than total levels of reactive IgA antibodies.[15] In this study, we observed that patterns of protein bands reactive with salivary IgA were variable amongst newborn (Fig. 2A). We reasoned that mucosal responses, most frequently detected in newborns to antigens of *S. mitis*, a pioneer colonizer of oral mucosa, might develop earlier than to *S. mutans*, which colonize children at a later age.[5,13,14] By separating proteins in 6% SDS–PAGE gels it is possible to visualize the three main cell-associated antigens of *S. mutans*, Ag I/II,[21] GTF C[22] and GbpB[5] with molecular masses of 185, 160 and 56 kDa respectively. These antigens are involved in the capacity of *S. mutans* to adhere and accumulate in the dental biofilm. A previous study

showed that some five-month-old children presented with salivary IgA reactive to all this antigens, especially to GbpB and may have a role in modulating the level of colonization by *S. mutans*.[15] In the present study, approximately 30% of the children evaluated ($n = 16/48$) presented IgA against AgI/II and GTFC, but not against GbpB (Table 1). Also, 20% of saliva samples from newborn children were reactive with a *S. mitis* 202 kDa component (Table 1), suggesting the presence of IgA reactive to IgA1-protease, an antigen important for *S. mitis* establishment in the oral cavity.[23,24]

In the present study we analysed the specificity of salivary SIgA antibodies reactive with *S. mutans*, *S. mitis* and *E. faecalis*, to test whether SIgA antibodies reactive with commensal oral bacteria were induced by these bacteria and were, therefore, specific to them or whether they were induced by cross-reactions with other bacteria. The results of cross-adsorption showed that in half of the saliva tested ($n = 5$ of 10), there was a reduction of the salivary IgA to *S. mutans* when the plate was previously absorbed with *S. mitis* antigens. A similar result of levels of salivary IgA to *S. mitis* occurred when the plate was covered with *S. mutans*. The elimination of salivary IgA antibodies reactive with the test species following sequential adsorption of saliva samples with each streptococcal species supports partially the conclusion that the antibodies were cross-reactive rather than species specific, as described previously.[18,25]

Although in our previous study we detected SIgA antibodies reactive with *S. mutans* in saliva of predentate infants who did not harbour *S. mutans*,[15] here, the presence of specific antibody at birth is unlikely to have been induced within 10 h, since it takes at least a week for the uptake, processing of antigen, B cell selection and migration to local sites, differentiation into plasma cells leading to antibody secretion and endosomal transfer into the gland lumen. Thus, some hypotheses can be raised to address this early response of SIgA to *S. mutans* and *S. mitis* antigens. Firstly, the presence of residual of IgA from maternal milk in the oral cavity of children cannot be excluded, even though the samples have been collected at least 3 h after breastfeeding. For this reason, we compared immunoblotting of infant salivary samples with their respective maternal milk samples (Fig. 2B). The majority of antigens that were more frequently reactive in the infant salivary samples were not recognized by maternal milk (Fig. 2B). Additionally, immunoblots from children who did not receive maternal milk (Fig. 1A, pair 10) presented with IgA antibody reactivity with *S. mutans* and *S. mitis* antigens. The persistence of secretory antibodies in the oral cavity (e.g., following breast feeding) strongly depend on their adhesion to salivary pellicle on tooth surfaces.[26] Since newborns are edentulous, this condition for persistence of maternal IgA is absent.

An alternative hypothesis could be associated with the plurispecific protection at mucosal surfaces, proposed by Quan and coworkers,[27] who found that SIgA antibodies from human saliva reacted with actin, myosin and tubulin but also with antigens from *Streptococcus pyogenes*. Also, those antibodies could result from stimulation without antigenic exposure, as the result of anti-idiotype induction[28] or intra-uterine stimulation. Thus, several bacteria have been isolated from umbilical cord blood, amniotic fluid and foetal membranes without clinical or histological evidence of infection or inflammation in pairs of mothers and children.[29]

In summary, the results show that detectable levels of salivary IgA antibodies reactive to oral bacterial species can be detected within the first hours after birth. Furthermore, the salivary IgA concentrations and IgA antibody specificities appear to influenced by the gestational age, which might reflect the level of immunological maturity of the mucosal immune system. These findings support further study about the investigation of antibody and microbial sources from mother in order to clarify the role and development of mucosal immune response in neonates.

Acknowledgments

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), proc. 07/57346-5, and proc. 07/50807-7 and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), proc. 472928/2007-4.

Ethical approval: This study was approved by the Ethical Committee of the Medical School of Ribeirao Preto, SP, Brazil, reference number: 2963/2007.

REFERENCES

1. Russell MW, Hajishengallis G, Childers NK, Michalek SM. Secretory immunity in defense against cariogenic mutans streptococci. *Caries Res* 1999;**33**(1):4–15.
2. Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;**62**(1):71–109.
3. Brandtzaeg P, Farstad IN, Haraldsen G, Jahnsen FL. Cellular and molecular mechanisms for induction of mucosal immunity. *Dev Biol Stand* 1998;**92**:93–108.
4. Gleeson M, Cripps AW, Clancy RL. Modifiers of the human mucosal immune system. *Immun Cell Biol* 1995;**73**(5):397–404.
5. Smith DJ, King WF, Akita H, Taubman MA. Association of salivary immunoglobulin A antibody and initial mutans streptococcal infection. *Oral Microbiol Immunol* 1998;**13**(5):278–85.
6. Wan AK, Seow WK, Purdie DM, Bird PS, Walsh LJ, Tudehope DI. Immunoglobulins in saliva of preterm and full-term infants. A longitudinal study from 0-18 months of age. *Oral Microbiol Immunol* 2003;**18**(2):72–8.
7. Maruyama K, Hida M, Kohgo T, Fukunaga Y. Changes in salivary and fecal secretory IgA in infants under different feeding regimens. *Pediatr Int* 2009;**51**(3):342–5.
8. Clapp DW. Developmental regulation of the immune system. *Semin Perinatol* 2006;**30**(2):69–72.
9. Kiliegman RM, Rottman CJ, Behrman RE. Strategies for the prevention of low birth weight. *Am J Obstet Gynecol* 1990;**162**(4):1073–83.
10. Pearce C, Bowden GH, Evans M, Fitzsimmons SP, Johnson J, Sheridan MJ, et al. Identification of pioneer viridans streptococci in the oral cavity of human neonates. *J Med Microbiol* 1995;**42**(1):67–72.
11. Hohwy J, Reinholdt J, Kilian M. Population dynamics of *Streptococcus mitis* in its natural habitat. *Infect Immun* 2001;**69**(10):6055–63.
12. Seow WK, Lam JH, Tsang AK, Holcombe T, Bird PS. Oral Streptococcus species in pre-term and full-term children – a longitudinal study. *Int J Paediatr Dent* 2009;**19**(6):406–11.

13. Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res* 1993;**72**(1):37–45.
14. Alves AC, Nogueira RD, Stipp RN, Pampolini F, Moraes AB, Gonçalves RB, et al. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. *J Med Microbiol* 2009;**58**(4):476–8.
15. Nogueira RD, Alves AC, Napimoga MH, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. *Infect Immun* 2005;**73**(9):5675–84.
16. Nogueira RD, Alves AC, King WF, Goncalves RB, Höfling JF, Smith DJ, et al. Age-specific salivary immunoglobulin A response to *Streptococcus mutans* GbpB. *Clin Vaccine Immunol* 2007;**14**(6):804–7.
17. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. 'Checkerboard' DNA–DNA hybridization. *Biotechniques* 1994;**17**(4):788–92.
18. Cole. et al. Humoral immunity to commensal oral bacteria in human infants: salivary secretory immunoglobulin A antibodies reactive with *Streptococcus mitis* biovar 1, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, and *Enterococcus faecalis* during the first two years of life. *Infect Immun* 1999;**67**:1878–86.
19. Peterson DA, McNulty NP, Guruge JL, Gordon JI. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe* 2007;**15**(2):328–39.
20. Brandtzaeg P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol* 2009;**70**(6):505–15.
21. Demuth DR, Davis CA, Corner AM, Lamont RJ, Leboy PS, Malamud D. Cloning and expression of a *Streptococcus sanguis* surface antigen that interacts with a human salivary agglutinin. *Infect Immun* 1988;**56**(9):2484–90.
22. Hanada N, Kuramitsu HK. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* gtfC gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. *Infect Immun* 1988;**56**(8):1999–2005.
23. Poulsen K, Reinholdt J, Jespersgaard C, Boye K, Brown TA, Hauge M, et al. Comprehensive genetic study of streptococcal immunoglobulin A1 proteases: evidence for recombination within and between species. *Infect Immun* 1998;**66**(1):181–90.
24. Könönen E, Jousimies-Somer H, Bryk A, Kilp T, Kilian M. Establishment of streptococci in the upper respiratory tract: longitudinal changes in the mouth and nasopharynx up to 2 years of age. *J Med Microbiol* 2002;**51**(9):723–30.
25. Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, Vine ND, Chargelegue D, Yu L, et al. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med* 1998;**4**(5):601–6.
26. Bamman LL, Gibbons RJ, Immunoglobulin A. antibodies reactive with *Streptococcus mutans* in the saliva of adults, children, and predentate infants. *J Clin Microbiol* 1979;**10**:538–43.
27. Quan CP, Bernman A, Pires R, Avrameas S, Bouvet JP. Natural polyreactive secretory immunoglobulin A autoantibodies as a possible barrier to infection in humans. *Infect Immun* 1997;**65**:3997–4004.
28. Smith DJ, Taubman MA. Ontogeny of immunity to oral microbiota in humans. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992;**3**:109–33.
29. Jiménez E, Fernández l. Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 2005;**51**(4):270–4.

ANEXO 4 (Artigo publicado em revista científica no ano de 2014)

Immunobiology 219 (2014) 830–835

Contents lists available at ScienceDirect

Immunobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/imbio

Prospective evaluation of cytokine in saliva of preterm and fullterm neonates

Maria Lucia Talarico Sesso[a], Mariana Castro Loureiro Borges[a], Virginia Paes Leme Ferriani[a], Vinicius Rangel Geraldo-Martins[b], Denise Bertulucci Rocha Rodrigues[b], Ruchele Dias Nogueira[b,*]

[a] Department of Pediatrics, Medical School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil
[b] Uberaba University, Uberaba, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 June 2014
Received in revised form 20 June 2014
Accepted 15 July 2014
Available online 10 August 2014

Keywords:
Cytokines
Interferon interleukins
Immunoglobulin A
Prematurity
Saliva

ABSTRACT

Little is known about the ontogeny of the cytokines in saliva of newborn. Previous studies showed that levels of immunoglobulin A (IgA) in saliva could be influenced by prematurity. So, the aim of this study was to analyze the levels of interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), interleukin 12 (IL-12), and interferon gamma (IFN-γ) in sample saliva of fullterm (FT) and preterm (PT) neonates at birth (T0) and after 3 months of age (T3). Saliva from 50 infants (25 FT and 25 PT) were collected at T0 and T3 and analyzed by Luminex Corporation (Austin, Texas, United States) multiplex assay. Clinical characteristics and social–economic data were assessed through questionnaires. All cytokines could be detected at birth in levels higher than found in T3. The mean levels and frequency of detection of cytokines were significantly higher in PT than FT at T0 ($P<0.05$). There were a positive association between IL-10 and infection ($P<0.05$) and IL-6 and stress ($P<0.005$). Salivary cytokines were detected within the first hours after birth and their levels decreased after 3 months. The cytokine levels were different between PT and FT children and appear to be influenced by stress situation and/or antigenic microbial challenge. The results confirm the necessity for further studies about the mucosal immune system by using of saliva as a source of diagnostic by identification of biomarkers of the status of the immune.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Since mucosal surfaces represent the interface between the host and the environment and are the most common portal of pathogen entry, early development of functional mucosal immune defense is essential for survival. Several factors may influence the development of an effective mucosal immune response, including breastfeeding, gestational age, contact to antigens, genetic factors, and stress (Maruyama et al., 2009).

Cytokines are peptides secreted by cells of immune response to regulate the activation and effector phases of inflammatory response (Clapp, 2006). Proinflammatory cytokines, such as: IL-6, IL-8, IL-12, IFN-γ, stimulates the inflammation (Meirovitz et al., 2010). Also, there are the anti-inflammatory cytokines: IL-10 and IL-13, which attenuate the inflammation by restricting the production of inflammatory cytokines and increase expression of soluble receptors (Sarrouh et al., 2007). These peptides can be released in response to microorganisms (Rang et al., 2001) and are important in controlling the response to antigenic challenges. Several cytokines play an important role in the protection of oral mucosa together with the adaptive immune response, i.e, IL-12 and IFN-γ can induce activation of secretory IgA response against different infectious agents (Bradney et al., 2002).

Saliva represents an important biofluid that have several functions in the first line of defense because it presents satisfactory levels of immunoglobulin A, cytokines, and antimicrobial peptides (Nurkka et al., 2001). Salivary levels of selected cytokines were associated with both oral diseases, as well as systemic diseases in adult's saliva in Crohn's disease (Szczeklik et al., 2012) and lichen planus (Zhang et al., 2008). In patients with periodontal disease IL-6 concentrations are elevated in samples of saliva (Costa et al., 2010; Johnson and Serio 2005; Teles et al., 2009). In children, increased levels of IL-6 were found in subjects submitted to some kind of

* Corresponding author at: Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto, Departamento de Puericultura e Pediatria, Av. dos Bandeirantes, 3900, CEP 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil. Tel.: +55 16 3602 2902; fax: +55 16 3602 2297.
E-mail addresses: malutase@yahoo.com.br (M.L.T. Sesso), mariana.ped@hotmail.com (M.C.L. Borges), vplferri@fmrp.usp.br (V.P.L. Ferriani), vinigmartins@hotmail.com (V.R. Geraldo-Martins), denise.rodrigues@uniube.br (D.B.R. Rodrigues), ruchele_nogueira@yahoo.com.br (R.D. Nogueira).

http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2014.07.015
0171-2985/© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

stress, such as sleep deprivation (Redwine et al., 2000) and mental problems (Keller et al., 2010).

Newborns are known to have a higher frequency of microbial infections than older children and adults, due to the immaturity of the immune system (Sadeghi et al., 2007), especially babies born prematurely who have five times higher susceptibility to bacterial infections (Clapp et al., 1989). Our previous study showed that salivary IgA could be detected in newborns and levels were higher in fullterm than in preterm children (Nogueira et al., 2012) in the first hours of life, suggesting that the prematurity could influence the ontogeny of the immune response (Nogueira et al., 2012).

Studies focused on the analysis of cytokines in samples of serum, plasma, amniotic liquid, and cervicovaginal fluid (Dammann and Leviton, 1997; Mehr and Doyle, 2000; Romagnoli et al., 2001; Holst et al., 2005; Jacobsson et al., 2005; Lyon et al., 2010; Wei et al., 2010), showing a positive correlation between the increase of proinflammatory cytokines, particularly IL-6 with prenatal intrauterine infection (Dammann and Leviton, 1997; Holst et al., 2005), preterm birth (Holst et al., 2005; Jacobsson et al., 2005; Lyon et al., 2010; Wei et al., 2010), and neonatal brain damage (Dammann and Leviton, 1997). Also, increased levels of IL-10 (Romagnoli et al., 2001; Cancelier et al., 2009) and IL-6 (Mehr and Doyle 2000; Cancelier et al., 2009) have been considered as prognostic indicators of neonatal sepsis in preterm infants.

So, there are few studies that elucidate the ontogeny of mucosal immune system in recent life, especially about cytokines. In this study, we characterized the levels of proinflammatory (IL-6, IL-12, and IFN-γ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines in saliva samples of fullterm (FT) and preterm (PT) children at birth and after 3 months of life.

Material and Methods

Patients and study design

A total of 123 (70 FT and 53 PT) children born in the Clinical Hospital of the Ribeirao Preto Medical School, in Brazil were enrolled in this study. Fifty children (25 FT and 25 PT) that had enough amounts of saliva were performed in Luminex® procedure. Those samples were collected in two visits: T0 and T3. Only healthy newborns with less than 10 h of life were included in this study. Children with congenital malformations, perinatal hypoxia, intracranial hemorrhage, with length or weight incompatible with gestational ages, or under antibiotic therapy were excluded.

The Ethical Committee of the Medical School of Ribeirao Preto (process: 2963/2007) approved this study and mothers gave written consent for participation. Gestational age was estimated from the reported date of last menstruation period and also by somatic evaluation.

Data collection

Information on gestational background, health of mother, and of newborn was obtained by interview with mother and clinical data from hospital. Analysis of interviews with mothers and of clinical evaluation allowed collecting several data about maternal and newborn health during the gestation and the delivery. We obtained information about presence of infection (i.e., chorioamnionitis and urinary infection), systemic and oral disease, and use of antibiotics or corticoids from mother during the pregnancy. At birth were evaluated the time of rupture of amniotic membrane, type of delivery, development hypoglycemia, apgar score, weight and height of newborn. After 3 months, other informations were obtained from mother about the baby's health such as, infection, respiratory disease, breastfeeding, and use of pacifier. Those data collected allowed knowing if the newborn was submitted to some type of stress (such as hypoglycemia, time of rupture of membrane higher than 18 h) and/or of contact with bacterial infection during the intrauterine life or after birth. So, those data were associated with levels of interleukin found in the samples of saliva.

Collection of samples

Samples of whole unstimulated saliva were collected using sterile polypropylene transfer pipettes. Collections were performed in all children at approximately 4–10 h after birth in order to standardize the collection and the oral microbial exposure, and at least 3 h after breastfeeding to avoid contamination with non-salivary components. Solution of 250 mM EDTA, pH 5.2 (Sigma, St Louis, MO, USA) was added to each sample prior to transport on ice to the laboratory where they were stored at −80 °C until analysis.

Quantification of cytokines using Luminex®

Cytokine levels were determined using a multiplexed bead immunoassay as described by Teles et al (2009). Saliva were diluted 1:16 in PBS-BN (PBS [Sigma], 1% bovine serum albumin [Sigma], 0.05% sodium azide [pH 7.4]), then filtered on 0.22 μM centrifuge tube filters (Spin-X, CoStar) at 10,000 RPM for 10 min. Four cytokines: IL-6, IL-10, IL-12, and IFN-γ were measured using the human high-sensitivity cytokine of four-plex antibody bead kit (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Briefly, the beads coated with monoclonal antibodies against the 4 different cytokines were added to the wells. Samples and standards were pipetted into the wells and incubated for 2 h with the beads. The wells were washed and biotinylated secondary antibodies were added. After incubation the wells were washed followed by an incubation of 30 min with streptavidin conjugated to the fluorescent protein, R-phycoerythrin (streptavidin-RPE). After washing to remove the unbound streptavidin-RPE, the beads (minimum of 100 per analysis) were analyzed in the Luminex 100™ instrument (MiraiBio, Alameda, CA). Samples below the detection limit of the assay were recorded as zero, while samples above the upper limit of quantification (ULQ) of the standard curves were assigned the highest value of the curve.

Statistical analysis

Differences in levels of salivary cytokines and clinical data related to mother and infant health between groups (PT and FT) and visits (T0 and T3) were examined using the ANOVA test. chi-square test was used to analyze differences in the frequency of detection of each cytokine between groups and data obtained from questionnaires. Pearson correlation was used to assess correlation between levels of cytokines and data on mother and infant health. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

Population data

Fullterm and PT children were born at mean gestational ages of 39.1 (SD: 1.22, range: 37–41) and 34.3 (SD: 2.19, range: 30–36.5) weeks, respectively. All children were delivered by cesarean section.

Levels of interleukins: IL-6, IL-10, IL-12, and IFN-γ

The distribution of cytokine levels in saliva samples in PT and FT infants at birth (T0) and at 3 months (T3) are shown in Fig. 1. Comparison of cytokine levels and frequency of positive detection

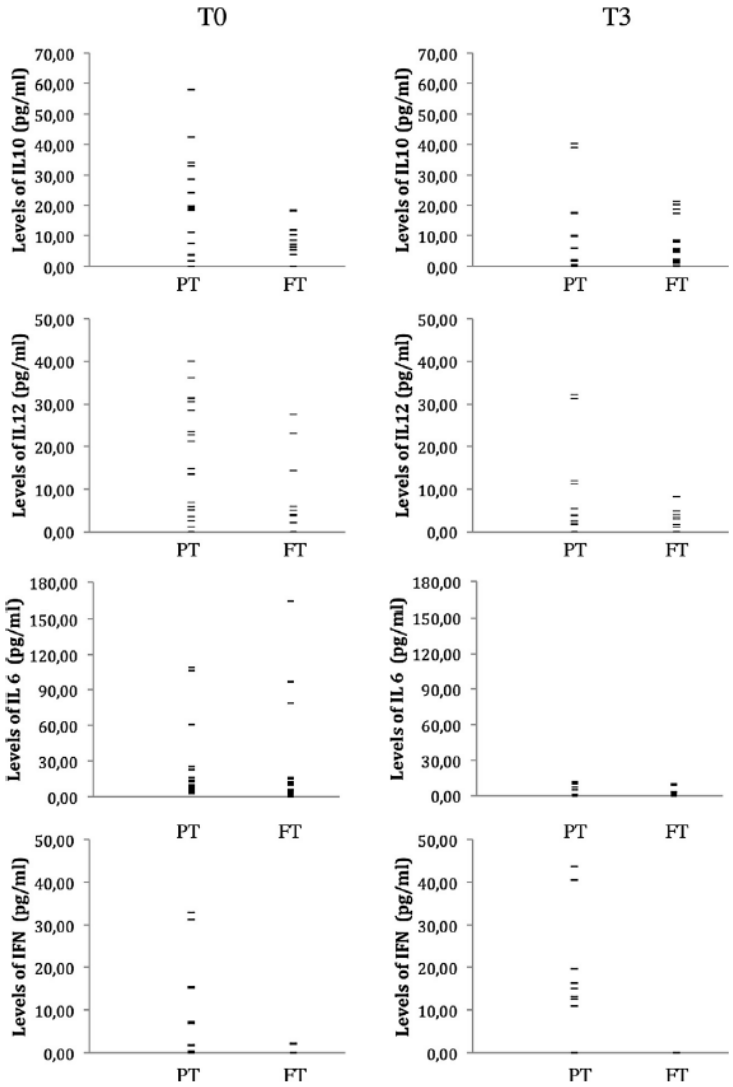


Fig. 1. Fluctuation of levels of IFN-γ, IL-10, IL-12, and IL-6 in pg/mL in each saliva samples of 25 pairs of PT and FT at birth (T0) and after 3 months follow-up (T3).

of each interleukin at T0 and T3 in the groups of PT and FT children is shown in Table 1.

At birth (T0), the mean levels of the four cytokines studied, IFN-γ, IL-10, IL-12, and IL-6 were significantly higher in PT than in FT children ($P<0.05$). The frequency of children with positive detection of IFN-γ, IL-10, and IL-12 at birth (chi-square test, $q>7.01$; $P<0.05$) was significantly higher in PT as compared to FT infants. Saliva IL-6 levels were detected in samples of all PT and FT children, in both visits.

At the 3 months prospective evaluation (T3), we did not find significant differences in the mean levels of interleukins IL-10, IL-12, and IL-6 between groups ($P>0.05$). On the other hand, preterm infants showed higher levels of IFN-γ ($P>0.05$) when compared to FT group. Frequency of IL-6 and IL-10 detection was significantly higher in FT ($n=19$) than in PT ($n=12$) (chi-square test, $q=6.2$; $P<0.05$). In contrast, no FT baby presented detectable levels of IFN-γ, while 8 PT children had positive response to this interferon (Chi-square test, $q=11.5$; $P<0.01$). There were no significant differences in the number of PT ($n=13$) and FT ($n=10$) children with undetectable IL-12 levels (chi-square test, $q=0.03$; $P>0.54$).

Fig. 2 shows the mean levels of each interleukin from T0 to T3. The prospective analysis showed that the levels of interleukins in PT decreased significantly (IL-10: $P=0.009$, IL-12: $P=0.001$, IL-6: $P=0.001$) from T0 to T3, while levels of IFN-γ increased with age ($P=0.03$). In the group of FT children, we observed significant decreasing difference from T0 to T3 for IL-12 and IL-6 ($P<0.05$). For IL-10 and IFN-γ levels, no significant differences were found ($P>0.11$) between visits.

Association between clinical information and cytokines levels

Table 2 shows the frequency of children that were submitted to some types of situation of stress and/or infection during the intrauterine life and/or after birth.

Table 1
Distribution and comparison of mean levels and number of children with positive response to IFN-γ, IL-10, IL-12, and IL-6 cytokines in saliva samples from 25 pairs of preterm (PT) and fullterm (FT) infants at birth (T0) and at 3 months (T3).

	T0		T3	
Cytokines	PT	FT	PT	FT
IFN				
Mean	4.67*	0.17*	6.88*	0.00*
SD	9.16	0.57	12.17	0.00
Number of children with positive response (%)	12 (48)**	2 (8)**	8 (32)**	0 (0)**
IL-10				
Mean	17.03*	4.25*	6.10	5.85
SD	14.79	5.53	11.16	6.64
Number of children with positive response (%)	21 (84)**	12 (48)**	12 (48)**	19 (76)**
IL-12				
Mean	15.60*	7.34*	4.37	2.06
SD	11.87	8.64	8.66	2.45
Number of children with positive response (%)	25 (100)**	20 (80)**	12 (48)	15 (60)
IL-6				
Mean	21.60*	18.18*	2.49	2.03
SD	29.50	37.63	4.11	2.50
Number of children with positive response (%)	25 (100)	25 (100)	12 (48)**	19 (76)**

* Difference statistically significant (ANOVA, $P < 0.05$).
** Difference statistically significant (chi-square test, $P < 0.05$, $q > 0.50$).

Fifty percent of mothers with infection during the pregnancy presented urinary infection followed by toxoplasmosis and syphilis. The main occurrence of stress was before the birth when the time of rupture of membrane was higher than 18 h. After birth two situation of stress in PT group were reported: hypoglycemia ($n = 4$) and icteric neonatal ($n = 6$). All children FT ($n = 5$) presented icteric neonatal as a situation of stress. There were differences statistically significant between groups of PT and FT in relation to stress before (chi-square, $P < 0.05$, $q = 7.08$) and after birth (chi-square, $P < 0.05$, $q = 5.55$).

Children submitted to situation of stress and/or of contact with bacterial infection during the intrauterine life or after birth were associated with levels of interleukin found in the sample saliva collected at T0. In the PT group, there was a positive correlation

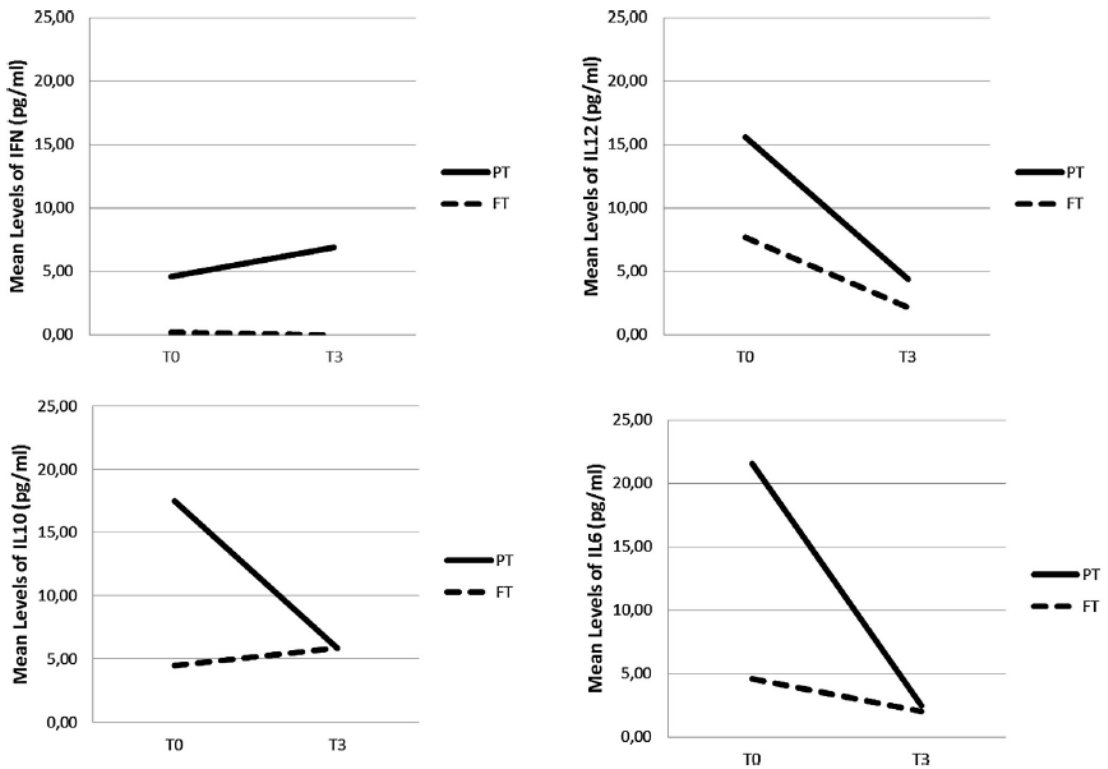


Fig. 2. Evolution of the mean levels of IFN-γ, IL-10, IL-12, and IL-6 in FT and PT infants from birth (T0) to 3 months of age (T3).

Table 2
Number of children in PT and FT groups submitted to some type of stress and/or infection in the intrauterine life and after birth.

Number of children (%) in each group: Data collection:	PT (n = 25)	FT (n = 25)
Intrauterine life		
Infection	10 (40.0)	5 (20.0)
Stress	10 (40.0)*	2 (8.0)*
Afterbirth		
Infection	5 (20.0)	2 (8.0)
Stress	13 (52.0)**	5 (20.0)**

* Differencestatisticallysignificant, $P < 0.05$, $q = 7.08$.
** Differencestatisticallysignificant, $P < 0.05$, $q = 5.55$.

between levels of IL-6 with stress in the intrauterine life (Pearson Correlation, $P \leq 0.05$, $rs = -0.65$) and after birth (Pearson Correlation, $P \leq 0.05$, $rs = -0.58$). Also, in FT, a positive correlation between levels of IL-6 with stress in the intrauterine life (Spearman Correlation, $P < 0.05$, $rs = -0.48$) and after birth (Pearson Correlation, $P \leq 0.05$, $rs = -0.65$).

Discussion

There is little information about the ontogeny of the mucosal immune system by the analysis of immunological components of saliva in early life, when the children are exposed to a wide diversity of microorganisms through the oral cavity. The majority of studies that evaluated cytokines focused on other types of samples such as blood, amniotic liquid, and cervicovaginal fluid (Dammann and Leviton, 1997; Mehr and Doyle 2000; Romagnoli et al., 2001; Holst et al., 2005; Jacobsson et al., 2005; Lyon et al., 2010; Wei et al., 2010). Studies with saliva were found in older children (Redwine et al., 2000; Keller et al., 2010) and adults (Costa et al., 2010; Johnson and Serio 2005; Teles et al., 2009). Here, our interests were analyzed on levels and frequency of detection of cytokines in minimally invasive measurement approach by the saliva collection in samples of newborns, born at term and preterm, in the first hours of life and after 3 months in order to check the development and subsequent production of cytokines in saliva.

The results showed the mean levels of all salivary cytokines were higher in T0 than in T3 in both groups. Also, there were several differences in the detection of cytokines in the samples of saliva between PT and FT, as in relation to the mean levels, as in the frequency of positive detection of some cytokines. At T0, the mean levels of all cytokines were significantly higher in PT than in FT group. Also, IL-10, IL-12, and IFN-γ cytokines were more frequently detected in PT, excepting the IL-6 that was detected in all children. After 3 months, the cytokine levels decreased in both groups, excepting for IFN-γ that increased from T0 to T3 in PT group and were detected in 32% of those children, which do not happen in FT group, because no one child presented this interferon. Those results suggest that the patterns of development of the mucosal immune system represented by saliva compounds are different in accordance to gestation age and other influences after birth, such as infection, situation of stress.

The maturation of innate immunity appears to occur before the adaptive response, since a previous study, with the same samples, also, showed differences between PT and FT, but the levels of IgA were different and higher in FT (up to 2.5-fold) than PT (Nogueira et al., 2012), maybe because in the absence of specific adaptive immunity already, the innate mechanism of defense can develop and provide non-specific protection in fetal life and at birth in the preterm children.

The identification of markers of the status of the immune response by detection of cytokines may give information about the ontogeny of mucosal immune system and susceptibility to various infections. Analysis of maternal health during the pregnancy and of neonate allowed finding some association with levels of cytokines between groups. The levels of IL-10 did not present a positive association with maternal bacterial infection in both groups, although studies showed that IL-6 and IL-10 are important inflammatory biomarkers of neonatal sepsis in blood (Bender et al., 2008), because the increased levels of IL-10 were detected in serum of premature infants with sepsis (Romagnoli et al., 2001; Cancelier et al., 2009) and of IL-6 in umbilical cord blood in newborns with early neonatal sepsis from mothers with chorioamnionitis (Chiesa et al., 2003).

On the other hand, the results showed a positive association between levels of IL-6 and stress in both groups, which is in accordance to a study, with children of 8–9 years old, who suffered some kind of stress, such as sleep deprivation, that showed increased levels of IL-6 in saliva when compared with those not under stress (Redwine et al., 2000). Also, Keller et al. (2010) indicated that greater levels of salivary IL-6 were associated with children's mental health (such as depression and anxiety).

In summary, salivary cytokines were detected within the first hours after birth and their levels decreased after 3 months. The cytokine levels appear to be influenced by gestational age, which might reflect a stress situation during the pregnancy or after birth. So, the present study contributes to the understanding of ontogeny of cytokine production in saliva in recent life, but longitudinal comparisons of PT and FT infants could be helpful to clarify the extension to which this difference is maintained over time. The results confirm the necessity for further studies about the mucosal immune system by using saliva as a source of diagnostic by identification of biomarkers of the status of the immune, especially in newborn infants, because it is fast and non-invasive, the collection of saliva has obvious advantages in comparison with blood samples, which may represent a "mirror of body" in health and disease.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), proc. 07/57346-5, and proc. 07/50807-7 and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), proc. 472928/2007-4. We thank Dr. Daniel James Smith and Willian King fromThe Forsyth Institute, Boston for allowing use of the Luminex equipment.

References

Bender, L., Thaarup, J., Varming, K., Krarup, H., Ellermann-Eriksen, S., Ebbesen, F., 2008. Early and late markers for the detection of early-onset neonatal sepsis. Dan. Med. Bull. 55, 219–223.
Bradney, C.P., Sempowski, G.D., Liao, H.X., Haynes, B.F., Staats, H.F., 2002. Cytokines as adjuvants for the induction of anti-human immunodeficiency virus peptide immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies in serum and mucosal secretions after nasal immunization. J. Virol. 76, 517–524.
Cancelier, A.C., Petronilho, F., Reinke, A., Constantino, L., Machado, R., 2009. Inflammatory and oxidative parameters in cord blood as diagnostic of early-onset neonatal sepsis: a case-control study. Pediatr. Crit. Care Med. 10, 467–471.
Chiesa, C., Pellegrini, G., Panero, A., Osborn, J.F., Signore, F., Assumma, M., 2003. C-reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications, and infection. Clin. Chem. 49, 60–68.
Clapp, D.W., Baley, J.E., Gerson, S.L., 1989. Gestational age-dependent changes in circulating hematopoietic stem cells in newborn infants. J. Lab. Clin. Med. 113, 422–427.
Clapp, D.W., 2006. Developmental regulation of the immune system. Semin. Perinatol. 30, 69–72.
Costa, P.P., Trevisan, G.L., Macedo, G.O., Palioto, D.B., Souza, S.L., Grisi, M.F., Novaes Jr., A.B., Taba, M., 2010. Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. J. Periodontol. 81, 384–391.

Dammann, O., Leviton, A., 1997. Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. Pediatr. Res. 42, 1–8.
Holst, R.M., Mattsby-Baltzer, I., Wennerholm, U.B., Hagberg, H., Jacobsson, B., 2005. Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical fluid in a population of Swedish women in preterm labor: relationship to microbial invasion of the amniotic fluid, intra-amniotic inflammation, and preterm delivery. Acta Obstet. Gynecol. Scand. 84, 551–557.
Jacobsson, B., Mattsby-Baltzer, I., Hagberg, H., 2005. Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical and amniotic fluid: relationship to microbial invasion of the chorioamniotic membranes. BJOG 112, 719–724.
Johnson, R.B., Serio, F.G., 2005. Interleukin 18 concentrations and the pathogenesis of periodontal disease. J. Periodontol. 5, 785–790.
Keller, P.S., El-Sheikh, M., Vaughn, B., Granger, D.A., 2010. Relations between mucosal immunity and children's mental health: the role of child sex. Physiol. Behav. 101, 705–712.
Lyon, D., Cheng, C.Y., Howland, L., Rattican, D., Jallo, N., Pickler, R., Brown, L., McGrath, J., 2010. Integrated review of cytokines in maternal, cord, and newborn blood: part I—associations with preterm birth. Biol. Res. Nurs. 11, 371–376.
Maruyama, K., Hida, M., Kohgo, T., Fukunaga, Y., 2009. Changes in salivary and fecal secretory IgA in infants under different feeding regimens. Pediatr. Int. 51, 342–345.
Mehr, S., Doyle, L.W., 2000. Cytokines as marker of bacterial sepsis in newborn infants: a review. Pediatr. Infect. Dis. J. 19, 879–887.
Meirovitz, A., Kuten, M., Billan, S., Abdah-Bortnyak, R., Sharon, A., Peretz, T., Sela, M., Schaffer, M., Barak, V., 2010. Cytokines levels, severity of acute mucositis and the need of PEG tube installation during chemo-radiation for head and neck cancer: a prospective pilot study. Radiat. Oncol. 25, 5–16.
Nogueira, R.D., Sesso, M.L., Borges, M.C., Mattos-Graner, R.O., Smith, D.J., Ferriani, V.P., 2012. Salivary IgA antibody responses to *Streptococcus mitis* and *Streptococcus mutans* in preterm and fullterm newborn children. Arch. Oral. Biol. 57, 647–653.
Nurkka, A., Ahman, H., Korkeila, M., Jantti, V., Kayhty, H., Eskola, J., 2001. Serum and salivary anti-capsular antibodies in infants and children immunized with the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. Pediatr. Infect. Dis. J. 20, 25–33.
Rang, A., Heise, T., Will, H., 2001. Lack of a role of the interferon-stimulated response element-like region in interferon alpha-induced suppression of Hepatitis B virus *in vitro*. J. Biol. Chem. 276, 3531–3535.
Redwine, L., Hauger, R.L., Gillin, J.C., Irwin, M., 2000. Effects of sleep and sleep deprivation on interleukin-6, growth hormone, cortisol, and melatonin levels in humans. J. Clin. Endocrinol. Metab. 85, 3597–3603.
Romagnoli, C., Frezza, S., Cingolani, A., De Luca, A., Puopolo, M., et al., 2001. Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis. Eur. J. Pediatr. 160, 345–350.
Sadeghi, K., Berger, A., Langgartner, M., Prusa, A.R., Hayde, M., Herkner, K., Pollak, A., Spittler, A., Forster-Waldl, E., 2007. Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling. J. Infect. Dis. 195, 296–302.
Sarrouh, B.F., Rivaldi, D., Gambarato, B.C., Santos, D.T., Silva, S.S., 2007. Importância das citoquinas no sistema imunológico: propriedades e características funcionais. Rev. Anal. 32, 42–48.
Szczeklik, K., Owczarek, D., Pytko-Polończyk, J., Kęsek, B., Mach, T.H., 2012. Proinflammatory cytokines in the saliva of patients with active and non-active Crohn's disease. Pol. Arch. Med. Wewn. 122, 200–208.
Teles, R.P., Likhari, V., Socransky, S.S., Haffajee, A.D., 2009. Salivary cytokine levels in subjects with chronic peridontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. J. Periodontal Res. 44, 411–417.
Wei, S.Q., Fraser, W., Luo, Z.C., 2010. Inflammatory cytokines and spontaneous preterm birth in asymptomatic women: a systematic review. Obstet. Gynecol. 116, 393–401.
Zhang, Y., Lin, M., Zhang, S., 2008. NF-kappaB-dependent cytokines in saliva and serum from patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese population. Cytokine 41, 144–149.

ANEXO 5 **(Artigo publicado em revista científica no ano de 2014)**

ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY 60 (2015) 116–125

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/aob

Salivary antibody response to streptococci in preterm and fullterm children: A prospective study

Mariana Castro Loureiro Borges [a], *Maria Lucia Talarico Sesso* [a], *Luciana Rodrigues Roberti* [a], *Maria Angélica Hueb de Menezes Oliveira* [b], *Ruchele Dias Nogueira* [a,b,*], *Vinicius Rangel Geraldo-Martins* [b], *Virginia Paes Leme Ferriani* [a]

[a] *Department of Pediatrics, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil*
[b] *University of Uberaba, Minas Gerais, Brazil*

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 8 August 2014

Keywords:
Streptococcus mutans
Streptococcus mitis
IgA
Saliva
Prematurity

ABSTRACT

Objectives: Secretory immunoglobulins present in mucosa surfaces represent the first line of defense of the adaptive immune system against infectious challenges. Preterm (PT) neonates' humoral immunity is diminished compared to full-term (FT) newborns. The identification of important antigens (Ags) of virulence of oral species may help in the investigation of the mechanisms of antigenic stimulation and the development of the mucosal immune response. In the present study, we measured saliva levels of immunoglobulins A (IgA) and M (IgM) and characterized the specificity of IgA against Ags of several streptococcal species found early in life.

Methods: This was a prospective observational study. Salivary IgA (sIgA) antibody responses to bacterial species that are prototypes of pioneer (*Streptococcus mitis*, *S. sanguinis*, *S. gordonii*) and pathogenic (*Streptococcus mutans*) microorganisms of the oral cavity were studied in FT and PT children in two visits: at birth (T0) and at 3 months of age (T3). Salivas from 123 infants (72 FT and 51 PT) were collected during the first 10 h after birth (T0) and again at 3 months of age (T3). Salivary levels of IgA and IgM antibodies were analysed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A subgroup of 26 FT and 24 PT children were compared with respect to patterns of antibody specificities against different streptococci Ags using Western blot assays.

Results: No significant differences ($P > 0.05$) in salivary levels of IgA and IgM between FT and PT babies were found at birth. At T3, mean sIgA values were similar between groups and sIgM levels were significantly higher in PT than FT ($P < 0.05$). Western blot assays identified positive IgA response to streptococci in the majority of children, especially in the FT group. There were some differences between groups in relation to the frequency of children with positive response to Ags and intensity of IgA response. In general, oral streptococci Ags were more frequently detected and bands were more intense in FT than in PT, especially in T3. Prospective analysis of patterns of sIgA against Ags of different streptococcal species revealed an increase in complexity of the sIgA antibody response from the first day of birth (T0) to T3 in PT and FT.

* *Corresponding author at:* Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto, Departamento de Puericultura e Pediatria, Av. dos Bandeirantes, 3900, CEP 14049-900 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 16 3602 2902; fax: +55 16 3602 2297.
E-mail address: ruchele_nogueira@yahoo.com.br (R.D. Nogueira).
http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.08.003
0003–9969/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Conclusion: The patterns of sIgA response to streptococci Ags appear to be influenced by the gestational age, which might reflect the level of immunological maturity of the mucosal immune system.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The mucosal immune system represents the first line of defense of the adaptive immune response against infectious challenges. Antibacterial activity in secretions is mediated in part by secretory immunoglobulin A (SIgA) present in saliva and other body fluids.[1] The total levels of SIgA in saliva have been considered as an indicator of development of the mucosal immune system in children.[2,3] Transient reduction in levels of IgA detected in saliva was associated with increased susceptibility to infections of the gastrointestinal tract,[2,3] reinforcing the importance of the maturation mucosal immune susceptibility to infections.

There is some controversy about the ontogeny of the mucosal immune system, especially in the first months of life. Newborns have a higher incidence of colonization by several microorganisms when compared to adults or older children due to immaturity of the immune system.[4]

The oral cavity is the main entrance of microorganisms. *Streptococcus salivarius* (SSA) and *S. mitis* (SMI) represent the majority of bacteria that initially colonize the oral cavity.[5] Some of the pioneer species, such as SMI, *S. gordonii* (SGO), and SSA,[6,7] are associated with other diseases such as bacterial endocarditis. After the tooth eruption, new species are found in the mouth, such as *S. mutans* (SM).[8,9] SM can also be detected in children before tooth eruption.[10–12] SM is considered to be pathogenic for dental caries because of its ability to adhere and accumulate in the dental biofilm in the presence of sucrose and to produce and tolerate high concentrations of acids, which promote tooth demineralization.

The identification of important antigens (Ags) of virulence of oral species may help in the investigation of the mechanisms of antigenic stimulation on the mucosal immune response. The 153-kDa Ag of SGO was described as a glucosyltransferase (GTF) that may serve as a mechanism for colonization of the endocardium in infective endocarditis by mediating bacterial adhesion to human endothelium.[13] Studies in animal models showed that GTF production determined SGO ability to persist in the tooth surface biofilm.[14] Vacca-Smith et al.[15] purified a glucosyltransferase (GtfSs) from SSA with molecular weight of 170 kDa. IgA antibody levels to glucosyltransferase from SSA were detected in salivas of some children with 3–5 months of age.[16] Poulsen et al.[17] sequenced an IgA1 protease of SMI with 200 kDa. The 202-kDa Ag of SMI found in the present study also was detected in saliva samples of 6-month-old children.[18,19] Three main cell-associated Ags of SM have been shown to be involved in the capacity of these microorganisms to adhere and accumulate in the dental biofilm. These Ags include an adhesin (AgI/II) of 185 kDa, a GTF of 160 kDa, which synthesize glucan from sucrose, and a glucan-binding protein B (GbpB) with 56 kDa.[20] A previous study with Brazilian children of 5–11 months of age showed a high complexity of the salivary IgA response against Ags of SM,[18,21] indicating that the mucosal immune system is designed to respond to SM Ag challenge during the early stages of colonization. In addition, we have recently observed differences in neonatal IgA saliva levels and specificity to SM and SMI when full-term (FT) and preterm (PT) babies were compared.[22]

So, there is little information about the immune response during the early stages of bacterial challenge. It is possible that some factors can affect the initial response of pioneer species commensal of the oral cavity and may influence the patterns of immune response and the susceptibility to be colonized by other species, such as SM, later. In the present study, we analysed saliva levels of IgA and IgM and specificity of IgA against Ags of several streptococcal species at birth and after 3 months of age in FT and PT children.

2. Materials and methods

2.1. Study design

This is a prospective observational study performed at the *Hospital das Clinicas* of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, between October 2007 and May 2009. Fifty-one healthy PT newborns (<37 weeks of gestation) and 72 healthy FT newborns were included for the first evaluation of the study. Babies with congenital malformations, perinatal hypoxia, intracranial haemorrhage, with length or weight incompatible with gestational ages, and antibiotic therapy were excluded.

The prospective analysis of mucosal immune maturation was performed in 50 (26 FT and 24 PT) with similar levels of IgA, from 123 children, beginning at until 10 h of life (baseline, time zero (T0)) and 3 months thereafter (T3). The gestational age was calculated based on the first trimester ultrasound or through the newborn somatic evaluation using the Capurro et al.[23] method. The study was approved by the Ethics Committee of the Clinical of Hospital of the School of Medicine of Ribeirao Preto, University of São Paulo (Process number 2963/2007) and informed consent was obtained from the subjects' parents.

Patient demographic characteristics are listed in Table 1. Information on maternal and gestational background was obtained by interviewing the mother.

2.2. Collection of saliva

Samples of whole non-stimulated saliva were collected using sterile polypropylene transfer pipettes. Collections were performed in all children at approximately 4–10 h after birth

Table 1 – Demographic characteristics of children included in the study (mean ± SD) obtained by interview with mothers and clinical data.

	Preterm children (PT: $n = 51$)	Fullterm children (FT: $n = 72$)	P-value
Gestational age (weeks)	34.5 ± 2.2	39.1 ± 1.4	<0.005*
Birth weight (kg)	2.3 ± 0.3	3.2 ± 0.5	0.232
Birth length (cm)	44.2 ± 2.1	49.1 ± 2.4	<0.01*
Sex M/F	22/29	37/35	0.324
Self-declared skin colour W/B	51/21	40/11	0.356

W = white, B = black; M = Male, F = Female.
* Mann–Whitney, $P < 0.05$.

in order to standardize the collection and the oral microbial exposure, and at least 2 h after breast-feeding to avoid contamination with non-salivary components. A solution of 250 mM EDTA, pH 5.2 (Sigma, St. Louis, MO, USA), was added to each sample prior to transport on ice to the laboratory where they were stored at −80 °C until analysis.

2.3. Detection of streptococcal species in the oral cavity

The presence of SM, SMI, SGO, and SSA in samples of saliva of newborn children was investigated by chequerboard DNA–DNA hybridization with species-specific probes. Briefly, 0.5 M NaOH, pH 13.4 (Sigma), was added to saliva samples. After boiling, samples were applied and fixed by exposure to ultraviolet light (Hybrilinker, UVP, Upland, CA, USA) in individual lanes on a nylon membrane (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) using the chequerboard slot blot device (Minislot 30, Immunetics, Cambridge, MA, USA). Digoxigenin-labelled whole genomic DNA probes were prepared for each one of the reference strains (*S. mutans* (UA159), *S. mitis* (ATCC506), *S. gordonii* (ATCC10558), and *S. sanguinis* (ATCC29667)) using a random primer technique. These two DNA probes were hybridized perpendicularly to the lanes of the bacterial samples using the Miniblotter 45 (Immunetics Cambridge, MA, USA) at 70 °C. Bound probes were detected using phosphatase-conjugated antibody to digoxigenin (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) and revealed with CDP-Star® (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Two lanes in each run contained standards at concentrations of 10^5 and 10^6 cells of each species. The sensitivity of the assay was adjusted to permit detection of 10^4 cells of a given species by adjusting the concentration of each DNA probe. The signals developed on X-ray films were scanned in a densitometer (Bio-Rad GS-700 Imaging Densitometer, Hercules, CA, USA) and evaluated using the ImageQuant Software (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Signals were converted to absolute counts by comparison with the standards on the same membrane. Failure to detect a signal was recorded as zero.

2.4. Concentration of protein, IgA, and IgM

Total concentration of protein in saliva was determined by the method of Bradford (Sigma) to check for variations in salivary flow. Total levels of IgA and IgM were determined in capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as previously described.[21]

2.5. Salivary IgA reactivity against streptococcal antigens

Patterns of reactivity of salivary IgA antibody against SM (UA159), SMI (ATCC506), SGO (ATCC10558), and SSA (ATCC29667) Ags were determined in Western blot assays. Sixteen micrograms of Ag extracts prepared as previously described[21] were loaded per lane, separated by sodium dodecyl sulfate–6% polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred to nitrocellulose membranes. After being stained with Red Ponceau (Sigma), membranes were washed and blocked overnight at 4 °C (in Tris-buffered saline–Tween, pH 7.5, 5% nonfat milk). Incubations with samples diluted at 1:100 were performed at room temperature for 2 h. As negative controls, membranes were incubated only with blocking buffer, and as positive controls, membranes were incubated with a standard saliva sample obtained from an adult whose pattern of reaction with Ag extracts had been previously measured. The secondary antibody was goat IgG antihuman IgA conjugated with horseradish peroxidase (1:4000 dilutions). Antibody reactions were developed using an ECL system (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). For this purpose, immunoblots were incubated with ECL detection solution and then exposed to the same X-ray film for 5 min. The developed X-ray films were scanned in a scanning densitometer (Bio-Rad GS-700 Imaging Densitometer, Hercules, CA, USA) to analyse patterns of antigen recognition, including the number and intensity of reactive bands. A film blank value was subtracted from the value of the reactive band.

In order to determine whether any of the antibodies detected were uniquely specific for a single species, 20 saliva samples (9 PT and 11 FT) were adsorbed sequentially with Ags of cells of *S. mitis*, *S. mutans*, and *Enterococcus faecalis* as described by Wirth et al.[19] Antibody activities remaining after adsorption (%) were determined by dividing the optical density at 450 nm of each adsorbed saliva by that of the corresponding unabsorbed saliva at the same dilution and multiplying by 100.

2.6. Statistical analysis

Associations between concentrations of IgA, IgM, and total protein, and patterns of antibody reactions were tested by the Spearman correlation analysis. Comparisons of the frequencies of children with distinct IgA antibody specificities were tested by a Chi-square test. Differences in the densitometry values of reactive Ags between the subsets of PT and FT children were analysed by a Mann–Whitney U test and between visits by analysis of variance (ANOVA) test. The

Table 2 – Levels of salivary IgA, IgM, total protein concentration, levels of IgA normalized by the protein concentration multiplied by 100 (IgA/protein × 100) and levels of IgM normalized by the protein concentration multiplied by 100 (IgM/protein × 100) in FT and PT children (mean ± SD).

	T0			T3		
	PT ($n = 24$)	FT ($n = 26$)	P	PT ($n = 24$)	FT ($n = 26$)	P
IgA levels (μg/ml)	1.42 (±2.48)	2.0 (±2.47)	0.28	4.27 (±4.73)	4.88 (±5.14)	0.26
IgM levels (μg/ml)	1.44 (±2.7)	0.98 (±1.26)	0.37	8.57 (±7.39)	4.17 (±5.95)	0.001*
Protein levels (μg/ml)	951.54 (±511.64)	891.24 (±476.60)	0.11	545.82 (±402.92)	389.53 (±281.9)	0.007
IgA/protein × 100	0.14 (±0.15)	0.29 (±0.38)	0.39	1.29 (±1.98)	1.76 (±2.16)	0.009
IgM/protein × 100	0.14 (±0.23)	0.12 (±0.13)	0.43	2.23 (±2.79)	1.18 (±1.20)	0.007

* Mann–Whitney, $P < 0.05$.

mean number of IgA-reactive bands in Ags extracts was also determined and compared between the subsets of the PT and FT children. A P-value of <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Study population

Table 1 shows the characteristics of the two groups of children included in this study at birth. The mean gestational age was 34 weeks and 4 days for PT children (range: 33–36 weeks and 6 days) and 39 weeks and 1 day for AT group (range: 37 weeks and 2 days to 40 weeks and 6 days). The mean gestational age and birth length, as expected, were statistically different between PT and FT children (Mann–Whitney, $P < 0.05$). Skin colour, sex, and birth weight were not different between groups (Mann–Whitney, $P > 0.05$).

3.2. Levels of IgA, IgM, and proteins in salivas

In T0, mean levels of IgA, IgM, and protein concentration in saliva samples ($n = 123$) were 2.39 μg/ml (±7.59), 1.53 μg/ml (±4.54), and 944.5 μg/ml (±870.2), respectively. There was a positive association between levels of IgA and IgM in both groups (Spearman correlation: $r > 0.7$, $P < 0.001$) and between concentrations of IgA and IgM and total protein samples (Spearman correlation: $r > 0.81$, $P < 0.001$, and $r = 0.72$, $P < 0.001$, respectively, for IgA and IgM).

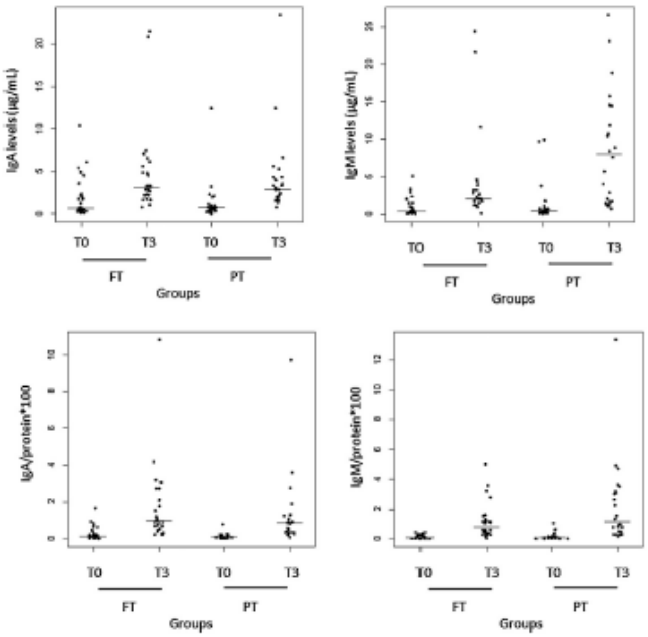


Fig. 1 – Levels of absolute amounts of IgA and IgM at birth (T0) and after 3 months (T3). Ratios of total salivary IgA and IgM amounts (μg/ml) that were divided by values of total protein concentration (μg/ml) measured in the same samples.

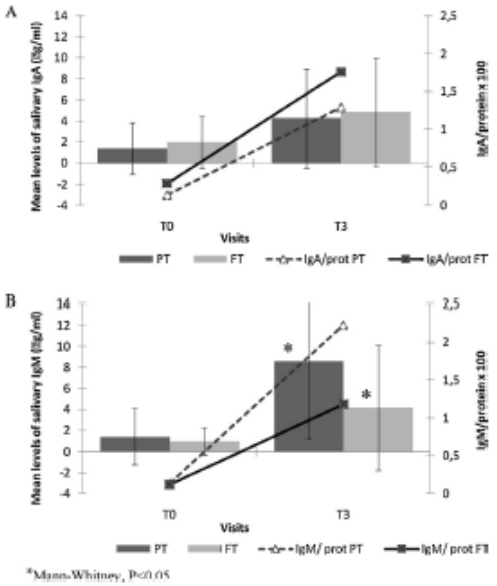


Fig. 2 – (A) Mean levels of IgA in saliva samples at baseline (T0) and after a 3-month follow-up (T3). The lines represent the values of IgA normalized by the amount of protein in PT and FT. (B) Mean levels of IgM in saliva samples at baseline (T0) and after a 3-month follow-up (T3). The lines represent the values of IgM normalized by the amount of protein in PT and FT.

Comparisons of IgA, IgM, and total protein levels in saliva samples of FT and PT babies (24 PT and 26 FT) are listed in Table 2 and Fig. 1. Fig. 1 shows the fluctuation of levels of immunoglobulins and proteins. Fig. 2 shows the mean levels of IgA (A) and IgM (B) and values normalized by the amount of proteins in saliva samples of 50 (24 PT and 26 FT) children who attended the whole follow-up period of 3 months (T0 and T3).

No significant differences ($P > 0.05$) in salivary levels of IgA and IgM between FT and PT babies were found at birth. At T3, IgA mean values were similar between groups, and IgM levels were significantly higher in PT than FT ($P < 0.05$). The prospective analysis of salivary levels of IgA and IgM showed a statistically significant increase in both groups ($P < 0.01$) from T0 to T3.

3.3. *Detection of streptococci species in oral samples*

Detection of streptococci in oral samples using chequerboard DNA–DNA hybridization assays showed that no children have detectable levels of SMI, SM, SSA, or SGO in saliva samples at T0 and T3.

3.4. *Frequency of detection of salivary IgA antibody to bacterial extracts*

Examples of immunoblots incubated with salivas from three representative pairs of PT and FT children against SM, SMI, SGO, and SSA Ags in T0 and T3 are shown in Fig. 3.

Table 3 shows the frequencies of children with detectable IgA to streptococci Ags and the number of IgA-reactive bands to antigens with molecular masses of 153 kDa of SGO, 170 kDa of SSA, 202 kDa of SMI, and 185, 160, and 56 kDa of SM in PT and FT at birth and at 3 months. The majority of children showed a positive IgA response to bacterial antigens, especially FT children for SSA and SMI Ags. In T0, there were differences between groups ($P < 0.05$) to Ags 170 kDa of SSA and 185 kDa of SM. At T3, there were several differences between groups in the patterns of IgA response to streptococcal Ags. In general, IgA response to Ags in FT children was more frequent and complex than PT children. Antigens 153 kDa of SGO, 202 kDa of SMI, and 160 kDa of SM were more frequently found in FT than PT babies ($P < 0.05$). Also, the frequency of children and the mean number of IgA reactive bands against SSA were significantly higher in FT than PT (Chi-square, $P < 0.05$, and Mann–Whitney, $P < 0.05$).

The results showed that SIgA antibody from 20 samples (9 PT and 11 FT) tested did not react with *E. faecalis* Ags, as SIgA responses to SM and SMI were not reduced by *E. faecalis* cross-adsorption. On the other hand, when samples ($n = 20$) were adsorbed with cells of SMI, there were mean reductions of 10% of SIgA to SM in two children (1 FT and 1 PT). In the same children ($n = 2$), there was also a mean reduction of 15% of SIgA to SMI when samples were adsorbed previously with cells of SM.

3.5. *Intensity of salivary IgA antibody to bacteria extracts*

Densitometry measures of each IgA reactive band were performed to reflect intensities of IgA reactions. There were variations in the intensities and numbers of IgA antibody

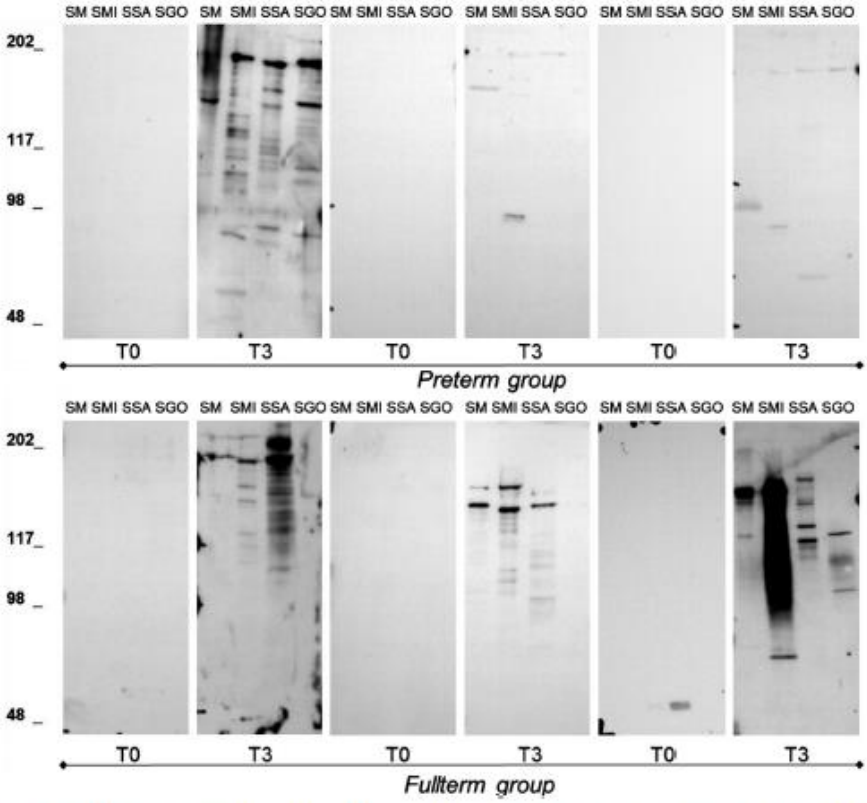


Fig. 3 – Patterns of IgA specificities against antigens from *S. mutans* (SM), *S. mitis* (SMI), *S. sanguinis* (SSA), and *S. gordonii* (SGO) in three pairs of children. Identities of antigen extracts are above each lane. Immunoblots from left and right panels are reactions obtained with salivas collected at baseline (T0) and after a 3-month follow-up (T6), respectively. Standard molecular sizes (kDa) are indicated in left the immunoblots.

reactions with the recognized bands among children in both groups (Fig. 4). After analysis of the intensity data, it became clear that some major antigens of SSA, SGO, and SMI were more strongly recognized by children. In general, FT children presented higher intensity of IgA to all Ags tested when compared with PT children, but those differences were not statistically significant (Mann–Whitney U test, $P > 0.2$) in both visits. The prospective analysis showed that, in the PT group, the total mean intensity of IgA responses to SM, SGO, and SSA were statistically different between visits (Fig. 4, ANOVA, $P < 0.05$). When analyzing the FT group, the total intensity of IgA to extracts was not statistically different in T0 as compared to T3 (Fig. 4, ANOVA, $P > 0.005$).

The mean intensity of salivary IgA response to virulence Ags from the streptococci tested is shown in Fig. 5. In T0, there were no differences in the intensity of the IgA response to specific Ags between groups. At 3 months (T3), the mean intensity of the IgA response to the 202 kDa Ag of SMI was significantly higher in FT children as compared to PT (Mann–Whitney, $P < 0.05$). When responses in T0 and T3 were compared, PT children presented significantly higher IgA response to 185 kDa Ag of SM in T3 (ANOVA, $P < 0.05$). In addition, the mean intensity of IgA response to 202-kDa Ag of SMI in FT was significantly higher in T3 (ANOVA, $P < 0.05$).

4. Discussion

SIgA is the principal Ig mediator of humoral immunity in the mucosal immune system. The main functions of these antibodies are the neutralization of pathogen (bacterial and viral) components involved in their virulence and blocking of important receptors for adhesion and invasion of tissues. In saliva, SIgA predominates. However, early in life, IgM is also regularly detected. IgG is a minor component of whole saliva entering via the minor salivary glands and gingival crevicular fluid.

Table 3 – Comparisons of the frequencies of children with positive salivary IgA responses to extracts of *S. gordonii* (SGO), *S. sanguinis* (SSA), *S. mitis* (SMI) and *S. mutans* (SM), to specific antigens of virulence from each bacteria groups and mean number of antigens recognized in preterm (PT) and fullterm (FT) groups.

Extracts of antigens	No. (%) of children with positive salivary IgA response			
	PT (*n* = 24)		FT (*n* = 26)	
	T0	T3	T0	T3
Streptococcus gordonii (SGO)	13 (54.1%)	12 (50%)	15 (41.6%)	17 (65.3%)
153 kDa Ag	6 (25.0%)	4 (16.6%)[a]	8 (30.7%)	11 (42.3%)[a]
Mean number of reactive Ags ± SD	1.9 ± 3.2	1.8 ± 3.2	1.7 ± 1.9	1.8 ± 1.7
Streptococcus sanguinis (SSA)	15 (62.5%)	13 (54.1%)[b]	20 (76.9%)	21 (80.7%)[b]
170 kDa Ag	6 (25.0%)[f]	5 (20.8%)	4 (15.4%)[f]	7 (26.9%)
Mean number of reactive Ags ± SD	2.2 ± 2.5	2.0 ± 2.9[e]	3.1 ± 3.4	3.5 ± 3.5[e]
Streptococcus mitis (SMI)	14 (58.3%)	12 (50%)	19 (73%)	18 (69.2%)
202 kDa Ag	3 (12.5%)	5 (20.8%)[c]	6 (23%)	14 (53.8%)[c]
Mean number of reactive Ags ± SD	2.5 ± 3.6	2.8 ± 4.0	3.8 ± 4.3	4.15 ± 3.2
Streptococcus mutans (SM)	13 (54.1%)	12 (50%)	12 (46.1%)	13 (50%)
185 kDa Ag	1 (4.1%)[g]	2 (8.3%)	3 (11.5%)[g]	5 (19.2%)
160 kDa Ag	5 (20.8%)	2 (8.3%)[d]	4 (15.4%)	8 (30.7%)[d]
56 kDaAg	1 (4.1%)	1 (4.1%)	0	3 (11.5%)
Mean number of reactive Ags ± SD	1.1 ± 1.3	1.0 ± 1.2	1.6 ± 2.2	2.0 ± 2.3

[a] Significant differences between PT and FT groups; Chi-square; $P \leq 0.05$, q: 3.9.
[b] Significant differences between PT and FT groups; Chi-square; $P \leq 0.05$, q: 4.0.
[c] Significant differences between PT and FT groups; Chi-square; $P \leq 0.05$, q: 5.8.
[d] Significant differences between PT and FT groups; Chi-square; $P \leq 0.05$, q: 3.9.
[e] Significant differences between PT and FT groups; Mann–Whitney; $P \leq 0.05$.
[f] Significant differences between PT and FT groups; Chi-square; $P \leq 0.05$, q: 9.5.
[g] Significant differences between PT and FT groups; Chi-square; $P \leq 0.05$, q: 11.3.

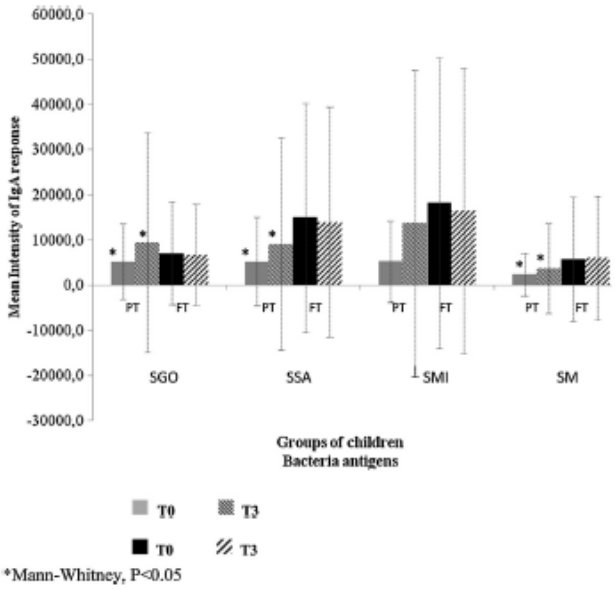
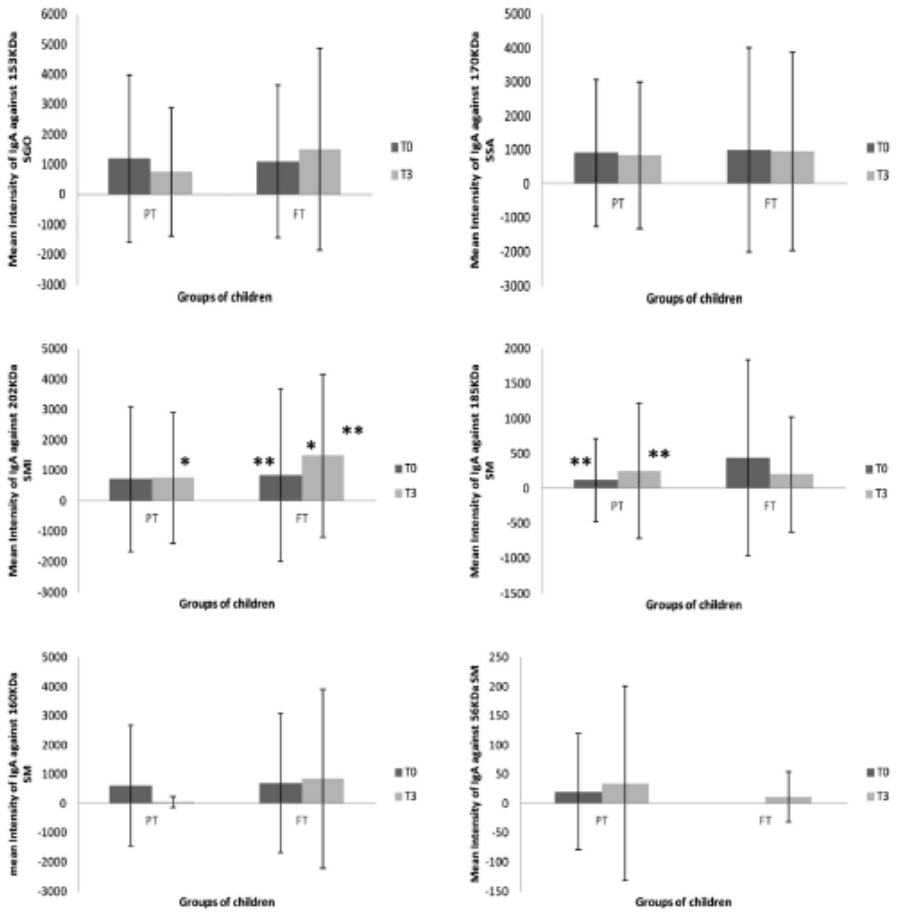


Fig. 4 – Intensities of salivary IgA reactions to specific bacteria among children in both groups in T0 and T3.



*Mann-Whitney, P<0.05

**ANOVA, P<0.05

Fig. 5 – Mean intensity of IgA against specific bands of antigens comparing groups of preterm and full-term children at birth (T0) and at 3 months (T3).

We have previously shown that salivary levels of IgA and IgM could be detected in neonates in the first day of life[22] in agreement with other observations.[2,3,24] It was also shown that levels of SIgA in preterm were significantly lower than in full-term newborns,[22] suggesting developmental differences in the mucosal adaptative immune system in children born at different gestational ages. Neonatal T cells have reduced expression of CD40 ligand, even when activated, resulting in a reduced production of the antibodies IgG and IgA by neonatal compared to adult B cells.[25] The delayed ontogeny of expression of these molecules may significantly decrease the adaptative immune response of preterm neonates, particularly in terms of antibody responses to various polysaccharide components of colonizing or invading bacteria and to bacterial vaccines.[26]

Aiming to assess the ontogeny of salivary antibodies during the first months of life, in the present study, we determined levels of IgA and IgM in saliva and the complexity of IgA response to microorganisms considered as pioneer bacteria of oral cavity in children at birth and after 3 months of age.

The results of the present study suggest that gestational age can influence the pattern of maturation of the immune response during the first months of life. In general, salivary Ig levels increased from baseline (at birth) to 3 months of age. In PT babies, the mean levels of IgM were 5.9 times higher in T3

than T0, while in FT, salivary IgM increased 4.2 times. In relation to IgA levels, there was an increase of 3.0 and 2.4 times in PT and FT, respectively. The main difference between groups occurred in the mean level of IgM that was two times as higher in PT than in FT at 3 months (T3).

Although the neonate's immune system is functionally developed and ready to respond to antigenic challenge, it is usually seen as germ free.[1] Previous studies showed that occurrence of salivary IgA antibody specific to SM Ags is independent of detectable infectious levels of this bacteria[21] in children of 5–11 months of age who have contact with highly infected people. In the present study, we also could not find detectable levels of those species in the infants' oral cavity, although SIgA antibodies reactive with SGO, SSA, SMI, and SM were observed in more than half of the children.

There were some differences between groups in relation to frequency of children with positive response to Ags and intensity of IgA response. In general, Ags were more frequently and strongly detected in saliva from FT than PT children, especially in T3. The prospective analysis of the intensity of the IgA reaction to the different streptococci species showed that the mean intensity of IgA response increased significantly from T0 to T3 in PT group, but not in FT children.

A possible explanation for the early SIgA response to streptococcal species would be that there is bacterial stimulation during breast-feeding, as bacterial DNA of streptococci, staphylococci, lactic acid bacteria, and bifidobacteria can be found in samples of human milk.[27,28] Thus, breast milk can be an important source of those bacteria influencing the development of the infant gut microbiota and stimulating the development of mucosal immune system. However, the origin of specific anti-streptococci IgA antibodies detected in saliva at birth is unlikely to be the breast milk, as it would take at least a week for the uptake and processing of Ag, B-cell selection and migration to local sites, differentiation into plasma cells leading to antibody secretion, and endosome transfer into the newborn salivary gland lumen.

A second hypothesis would be that bacterial Ags are transferred from the mother to the neonate by cord blood. Bacteria have been isolated from umbilical cord blood, amniotic fluid, and foetal membranes without clinical or histological evidence of infection or inflammation in pairs of mothers and children.[29–31] Such finding suggested that term foetuses are not completely sterile, and that a mother-to-child efflux of commensal bacteria exists.[31] Jiménez et al.[29] showed in samples of umbilical cord blood the presence of *E. faecium*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Streptococcus sanguinis*. Interestingly, these species are naturally present in children from the earliest days of life[31] and are generally regarded as commensal organisms in healthy children, although some children may develop opportunistic infections with such species.[29] Other studies showed in neonates the presence of cytomegalovirus[33] and papillomavirus[32] in human umbilical cord blood samples. In this way, bacteria species tested in the present study could be presented to the foetus in intrauterine life and thus stimulate the mucosal immune system development. However, as far as we know, there is no report of antibody response in the cord blood to the bacteria species tested in the present study.

In summary, our results show that detectable levels of salivary IgA and IgM antibodies increased from T0 to T3. The specific IgA response to streptococcal antigens was complex and intense especially to SSA and SMI Ags. There were several differences in the patterns of IgA response between groups. Although FT children showed a higher frequency of positive response to antigens mainly in T3, the intensity of IgA response did not increase between visits. On the other hand, in PT, the frequency of children with positive response to antigens decreased, but the intensity of response increased significantly when comparing samples collected at birth (T0) and at 3 months of age (T3). Therefore, the patterns of salivary IgA response to streptococci antigens appear to be influenced by the gestational age, which might reflect the level of immunological maturity of the mucosal immune system.

Funding

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado São Paulo (FAPESP), proc. 07/57346-5 and proc. 07/50807-7 and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), proc. 472928/2007-4.

Competing interests

None declared.

Ethical approval

This study was approved by the Ethical Committee of the Medical School of Ribeirao Preto, SP, Brazil, reference number: 2963/2007.

REFERENCES

1. Russell MW, Hajishengallis G, Childers NK, Michalek SM. Secretory immunity in defense against cariogenic mutans streptococci. *Caries Res* 1999;33:4–15.
2. Seidel BM, Schulze B, Kiess W, Vogtmann C, Borte M. Determination of secretory IgA and albumin in saliva of newborn infants. *Biol Neonate* 2000;78(3):186–90.
3. Wan AKL, Seow WK, Purdie DM, Bird PS, Walsh LJ, Tudehope DI. Immunoglobulins in saliva of preterm and full-term infants. A longitudinal study from 0 to 18 months of age. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:72–8.
4. Clapp DW. Developmental regulation of the immune system. *Semin Perinatol* 2006;30(2):69–72.
5. Pearce C, Bowden GH, Evans M, Fitzsimmons SP, Johnson J, Sheridan MJ, et al. Identification of pioneer viridans streptococci in the oral cavity of human neonates. *J Med Microbiol* 1995;42:67–72.
6. Baddour LM. Twelve-year review of recurrent native-valve infective endocarditis: a disease of the modern antibiotic era. *Rev Infect Dis* 1988;10(6):1163–70.
7. Sussman JI, Baron EJ, Tenenbaum MJ, Kaplan MH, Greenspan J, Facklam RR, et al. Viridans streptococcal endocarditis: clinical, microbiological, and

echocardiographic correlations. *J Infect Dis* 1986;**154**(4): 597–603.
8. Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res* 1993;**72**:37–45.
9. Smith DJ, King WF, Akita H, Taubman MA. Association of salivary immunoglobulin A antibody and initial mutans streptococcal infection. *Oral Microbiol Immunol* 1998;**13**:278–85.
10. Alves AC, Nogueira RD, Stipp RN, Pampolini F, Moraes ABA, Gonçalves RB, et al. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. *J Med Microbiol* 2009;**58**:476–81.
11. Tankkunnasombut S, Youcharoen K, Wisuttisak W, Vichayanrat S, Tiranathanagul S. Early colonization of mutans streptococci in 2- to 36-month-old Thai children. *Pediatr Dent* 2009;**31**(1):47–51.
12. Klein MI, Florio FM, Pereira AC, Hofling JF, Goncalves RB. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. *J Clin Microbiol* 2004;**42**:4620–6.
13. Vacca-Smith AM, Jones CA, Levine MJ, Stinson MW. Glucosyltransferase mediates adhesion of *Streptococcus gordonii* to human endothelial cells in vitro. *Infect Immun* 1994;**62**(6):2187–94.
14. Tanzer JM, Thompson AM, Grant LP, Vickerman MM, Scannapieco FA. *Streptococcus gordonii*'s sequenced strain CH1 glucosyltransferase determines persistent but not initial colonization of teeth of rats. *Arch Oral Biol* 2008;**53**(2):133–40.
15. Vacca-Smith AM, Ng-Evans I, Wunder D, Bowen WH. Studies concerning the glucosyltransferase of *Streptococcus sanguis*. *Caries Res* 2000;**34**(4):295–302.
16. Gahnberg L, Smith DJ, Taubman MA, Ebersole JL. Salivary-IgA antibody to glucosyltransferase of oral microbial origin in children. *Arch Oral Biol* 1985;**30**(7):551–6.
17. Poulsen K, Reinholdt J, Jespersgaard C, Boye K, Brown TA, Hauge M, et al. Comprehensive genetic study of streptococcal immunoglobulin A1 proteases: evidence for recombination within and between species. *Infect Immun* 1998;**66**(1):181–90.
18. Nogueira RD, Alves AC, King WF, Gonçalves RB, Höfling JF, Smith DJ, et al. Age-specific salivary immunoglobulin A response to *Streptococcus mutans* GbpB. *Clin Vaccine Immunol* 2007;**14**(6):804–7.
19. Wirth KA, Bowden GH, Kirchherr JL, Richmond DA, Sheridan MJ, Cole MF. Humoral immunity to commensal oral bacteria in human infants: evidence that *Streptococcus mitis* biovar 1 colonization induces strain-specific salivary immunoglobulin A antibodies. *ISME J* 2008;**2**(7):728–38.
20. Mattos-Graner RO, Jin S, King WF, Chen T, Smith DJ, Duncan MJ. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding Glucan Binding Protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. *Infect Immun* 2001;**69**(11):6931.
21. Nogueira RD, Alves AC, Napimoga MH, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. *Infect Immun* 2005;**73**(9):5675–84.
22. Nogueira RD, Sesso MLT, Borges MCL, Mattos-Graner RO, Smith DJ, Ferriani VPL. Salivary IgA antibody responses to *Streptococcus mitis* and *Streptococcus mutans* in preterm and fullterm newborn children. *Arch Oral Biol* 2012;**57**:647–53.
23. Capurro H, Konichezky S, Fonseca D. A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. *J Pediatr* 1978;**93**(1):120–2.
24. Maruyama K, Hida M, Kohgo T, Fukunaga Y. Changes in salivary and fecal secretory IgA in infants under different feeding regimens. *Pediatr Int* 2009;**51**(3):342–5.
25. Nonoyama S, Penix LA, Edwards CP, Lewis DB, Ito S, Aruffo A, et al. Diminished expression of CD40 ligand by activated neonatal T cells. *J Clin Invest* 1995;**95**:66–75.
26. Kaur K, Chowdlhury S, Greenspan NS, Schreiber JR. Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates. *Blood* 2007;**110**:2948–54.
27. Martín R, Heilig GH, Zoetendal EG, Smidt H, Rodríguez JM. Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *J Appl Microbiol* 2007;**103**(6):2638–44.
28. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG* 2002;**109**(5):527–33.
29. Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 2005;**51**(4):270–4.
30. Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* 2002;**68**(1):219–26.
31. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jimínez E, Marín ML, Xaus J, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 2003;**143**(6):754–8.
32. Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Perinatal transmission of human papilomavirus DNA. *Virol J* 2009;**21**:83–6.
33. Endo T, Goto K, Ito K, Sugiura T, Terabe K, Cho S, et al. Detection of congenital cytomegalovirus infection using umbilical cord blood samples in a screening survey. *J Med Virol* 2009;**81**(10):1773–6.