

Estudo da interação entre anticorpos monoclonais anti-*Streptococcus mutans* e antígenos de estreptococos orais

Evaluation of the interactions between anti-*Streptococcus mutans* monoclonal antibodies and oral streptococci antigens

Fujiko Yamasiro KRETCHETOFF

Professor Assistente – Disciplina de Microbiologia e Imunologia – Universidade de Mogi das Cruzes – UMC – Mogi das Cruzes – SP – Brasil
Mestre em Biopatologia Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil

Antonio Carlos Victor CANETTIERI

Professor Assistente – Disciplina de Microbiologia e Imunologia - Faculdade de Ciências da Saúde – UNIVAP– São José dos Campos – SP – Brasil
Doutorando – Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil

Daniella MOREIRA

Cirurgiã Dentista
Doutora em Biopatologia Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil

Fabio Condino FUJARRA

Mestrando – Dor Orofacial – Departamento Neurologia – Hospital Clínicas – Faculdade de Medicina – USP – São Paulo – SP – Brasil

Teresa Gomes de OLIVEIRA

Professor Titular - Disciplina de Microbiologia e Imunologia – Universidade de Mogi das Cruzes – UMC – Mogi das Cruzes – SP – Brasil

Carmelinda Schmidt UNTERKIRCHER

Professor Adjunto – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil

RESUMO

Nesse trabalho estudou-se a reatividade de dois anticorpos monoclonais (Acmo) anti-*Streptococcus mutans* (24A e 56G) desenvolvidos no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP, frente às cepas de estreptococos orais (*S. salivarius*, *S. mutans* e *S. pyogenes*) pelo ELISA e Western blot. Estes anticorpos eram da classe IgG2b e foram purificados em proteína A. O Acmo 56G mostrou ser o mais reativo com *S. mutans*. Testado no Western Blot (WB) com o antígeno citoplasmático (AgC) de *S. mutans*, 56G marcou uma única banda de 53kDa. Com o antígeno de superfície (AgSu) e com células inteiras dos microrganismos estudados, 56G reagiu com componentes de pesos moleculares mais elevados como 116 e 155 kDa. Foi detectada reatividade cruzada do Acmo 56G, no WB, com outros estreptococos orais (*S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*), constatando o compartilhamento de antígenos entre as espécies testadas, o que pode ser um fator importante no desenvolvimento de doenças, como a febre reumática.

UNITERMOS

Muromonab – CD3; *Streptococcus mutans*; *in vivo*, animal.

INTRODUÇÃO

Há mais de cinquenta anos muitos laboratórios vêm se esforçando para descobrir a estrutura molecular dos anticorpos. Os primeiros estudos foram realizados examinando sangue humano, mas a heterogeneidade desses anticorpos policlonais não permitia uma análise detalhada¹. Em 1975, Kohler & Milstein⁸ descreveram

uma técnica para imortalizar células secretoras de um único anticorpo específico, a técnica de hibridomas. Como resultado, sabe-se atualmente mais sobre a estrutura das moléculas de anticorpo que qualquer outro elemento do sistema imune¹.

Essa técnica baseia-se no fato que cada linfócito B produz anticorpo de uma única especificidade e envolve a fusão celular ou hibridização entre um

linfócito B normal, produtor de anticorpos e uma célula de mieloma, incapaz de secretar seus próprios anticorpos¹. Os anticorpos produzidos pelas células híbridas (hibridomas) são chamados monoclonais, ou seja, anticorpos produzidos por um único clone de linfócito B contra um único determinante antigênico da molécula de antígeno^{14,16}.

Essa técnica tornou-se extremamente valiosa na identificação de antígenos pouco conhecidos ou desconhecidos numa mistura, já que o anticorpo é empregado como uma sonda altamente específica¹⁻¹⁴. Na Odontologia, os anticorpos monoclonais têm sido utilizados em duas grandes frentes de pesquisa. A primeira estuda a relação entre estreptococos bucais e doenças sistêmicas, como glomerulonefrite pós-estreptocócica, febre reumática e endocardite bacteriana⁶. A segunda corrente quer definir o mecanismo de aderência de estreptococos, principalmente do grupo mutans, à superfície dentária e conseqüentemente definir meios para o desenvolvimento de uma possível vacina anticárie¹¹.

O objetivo desse trabalho foi pesquisar a reatividade de dois Acmo anti-*S. mutans* com cepas bacterianas orais, assim como, a capacidade destes na identificação de antígenos de *S. mutans*, pois a análise da especificidade de anticorpos monoclonais pode ajudar na seleção de antígenos interessantes para uma vacina anticárie.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção da ascite

Para a produção da ascite foi injetado 0,5ml de pristane por via intra peritoneal, em cinco camundongos BALB/c com oito semanas de idade. No décimo dia consecutivo, foram injetadas 106 células do clone produtor de anticorpo previamente selecionado. Aguardou-se o período de duas a três semanas e a seguir, a ascite foi colhida (5 a 10ml de ascite por camundongo), centrifugada e estocada a -20°C, após a adição de azida sódica a 0,02%. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP (008/98 – PA/CEP).

Análise das subclasses dos Acmo

Utilizou-se um “kit” de isotipagem (BIO RAD) constituído de anticorpos de coelho específicos para cada subclasse de IgG (anti-IgG₁, 2_a, 2_b ou 3) de camundongo e um conjugado anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (1/3000). Para revelação foram utilizadas nove partes de uma solução de sulfonato de 2'-2'-azino-di(3-

etil-benziltiazolina) e uma parte de uma solução peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida com ácido oxálico 2% e a leitura da D.O. realizada a 415nm.

Preparo dos antígenos citoplasmáticos e de superfície de *S. mutans*

S. mutans, cepa CCT 1910, foi cultivado em caldo tríplico de soja (TSB-DIFCO), a 37°C, por 24 horas, com 5% de CO₂ e em seguida mortas pelo formaldeído 0,075% e deixada por 18 horas a 4°C. Colheu-se as células por centrifugação, lavou-se em hidroximetilaminometano- ácido clorídrico (Tris-HCl) pH 7,5, 125mM, EDTA 10mM e ressuspendidas em 50ml do mesmo tampão, acrescentando-se fluoreto de fenilmetil sulfonil (PMSF-SIGMA) na concentração final de 5mM. Após, agitou-se vigorosamente com pérolas de vidro por toda noite, a 4°C. O lisado foi centrifugado e o sobrenadante dialisado contra água deionizada, concentrado e liofilizado passando a constituir o antígeno citoplasmático (AgC). Ao precipitado foi adicionado 5ml de Tris-HCl 150mM, pH 6,9 uréia 6M, Tween-20 1%, 2-mercaptoetanol 20mM. Ferveu-se por cinco minutos e foi conservado a 4°C por 24 horas. Foi feita a centrifugação e o sobrenadante dialisado exaustivamente contra água deionizada, concentrado, liofilizado e conservado a -20°C, passando a constituir o antígeno de superfície (AgSu). O conteúdo protéico foi determinado pelo método de Bradford 2 (1976).

Preparo das células inteiras de estreptococos

Cepas de *S. mutans* (CCT 1910 e SP), *S. sobrinus* 28A, *S. salivarius* (CCT0365) e *S. pyogenes* (CCT1500, T23 e cepa isolada no laboratório de Microbiologia da FOSJC-UNESP) foram cultivadas em TSB (Difco) por 24 horas e mortas pelo formaldeído a 0,075%. Após lavagem em solução salina tamponada com fosfato (PBS), por centrifugação a 7000 rpm, por 20min, a 25°C as suspensões foram padronizadas por espectrofotometria, a 595nm, para a densidade óptica (D.O.) de 0,200.

Os anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais 56G e 24A anti-*S. mutans* estudados foram desenvolvidos no laboratório de Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, pela Técnica de Hibridomas, e purificados em coluna de proteína A –Sephacrose (Pharmacia)⁵.

Imunização dos animais

Camundongos fêmeas da linhagem Balb/c foram imunizados por via intradérmica, na base da cauda,

com 200µg de AgC de *S.mutans* em adjuvante completo de Freund e reestimulados, por via intraperitoneal, 21 dias depois com 400µg do mesmo antígeno em PBS. Uma semana após a reestimulação, os animais foram anestesiados e o sangue colhido por via retro-ocular para análise sorológica.

ELISA

Placas de poliestireno (COSTAR) foram sensibilizadas com células inteiras de estreptococos em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6, por 2 horas a 37°C e por 18 h a 4°C. As placas foram bloqueadas com 0,5% de gelatina em PBS, por 30 minutos, a 37°C, e lavadas, após, com PBS contendo 0,1% de Tween-20 (PBS-T). As ascites (1/25) diluídas em PBS-T-gelatina (PBS-T-G) foram acrescentadas aos orifícios, em duplicata, e submetidas, após, a diluições consecutivas na razão dois. Incubou-se por 2 horas a 37°C e a 4°C por toda noite. Após lavagem com PBS-T, adicionou-se 50µl do conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase, numa concentração de 1µg/ml. A atividade de peroxidase foi revelada utilizando-se 100µl de ortofenilenodiamino por orifício (SIGMA), sendo 6mg em 12ml de tampão citrato-ácido cítrico 0,1M, pH 5,5 e 10µL de peróxido de hidrogênio a 0,003%. A reação foi bloqueada com 50µl de ácido sulfúrico a 2,5 N e as D.O. foram lidas 490nm, no leitor de ELISA (BIO RAD modelo 3550).

Eletroforese em gel de poliacrilamida e Western blot (WB)

Utilizou-se a técnica de WB desenvolvida de acordo com Towbin et al.¹⁸ (1979), onde obteve-se

a réplica do gel em nitrocelulose após eletroforese. Aplicou-se no gel 20µg de antígenos (AgSu e AgC) de *S.mutans* ou de células inteiras dos estreptococos estudados. Os sítios livres da nitrocelulose foram saturados com PBS-T contendo 5% de leite desnatado (Molico-Nestlé), sob agitação por duas horas. Incubou-se uma noite com o soro dos camundongos ou com a ascite de 56G, diluídos a 1/50 no mesmo tampão. Após lavagem das fitas com PBS-T, colocou-se conjugado anti-IgG de camundongo, marcado com peroxidase, duas horas à temperatura ambiente, sob agitação e novamente lavadas com PBS-T. Incubou-se com substrato diaminobenzidina (SIGMA) a 0,01%, em 0,1M de Tris-HCl, pH 7,5 e 0,003% de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida lavando-se a nitrocelulose várias vezes com água destilada.

RESULTADOS

Reatividade dos Acmo em ELISA

As ascites de 56G e 24A, foram testadas para duas cepas de *S.mutans* (SP e CCT 1910), *S.salivarius* (CCT 0365) e duas cepas de *S.pyogenes* (CCT 1500 e T23). Os Acmos produzidos por 56G, reagiram com as duas cepas de *S.mutans* testadas e fracamente com os demais microrganismos. Os Acmo produzidos por 24A reagiram com a mesma intensidade com *S.mutans* e *S.pyogenes* e reconheceram fracamente a cepa de *S.mutans* (CCT 1910) usada na imunização (Figura 1). Estes dados não foram analisados por procedimentos estatísticos, pois representam um ensaio isolado, onde cada ascite foi testado em duplicata.

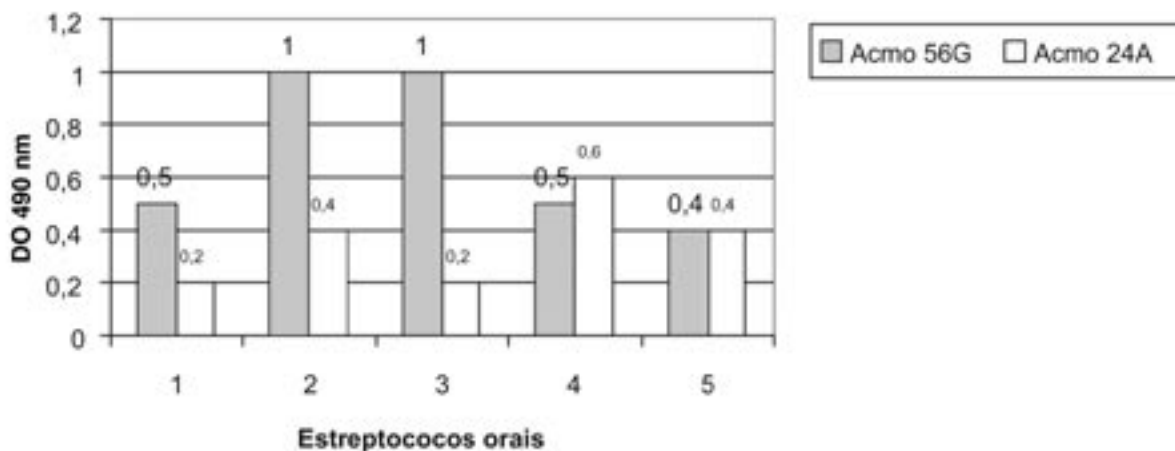


FIGURA 1 – ELISA. Reatividade dos Acmo 56G e 24A (5µg/ml) frente a 1) *S.salivarius* CCT 0365, 2) *S.mutans* SP, 3) *S.mutans* CCT 1910, 4) *S.pyogenes* CCT 1500, 5) *S.pyogenes* T23.

Reatividade do Acmo 56G no Western blot

A Figura 2 mostra a banda de 53 kDa reconhecida pelo Acmo 56G a partir do AgC de *S. mutans* (Figura 2-a) e ao lado a reação de soro de camundongo imunizado com *S. mutans* para o mesmo antígeno (AgC) (Figura 2-b).

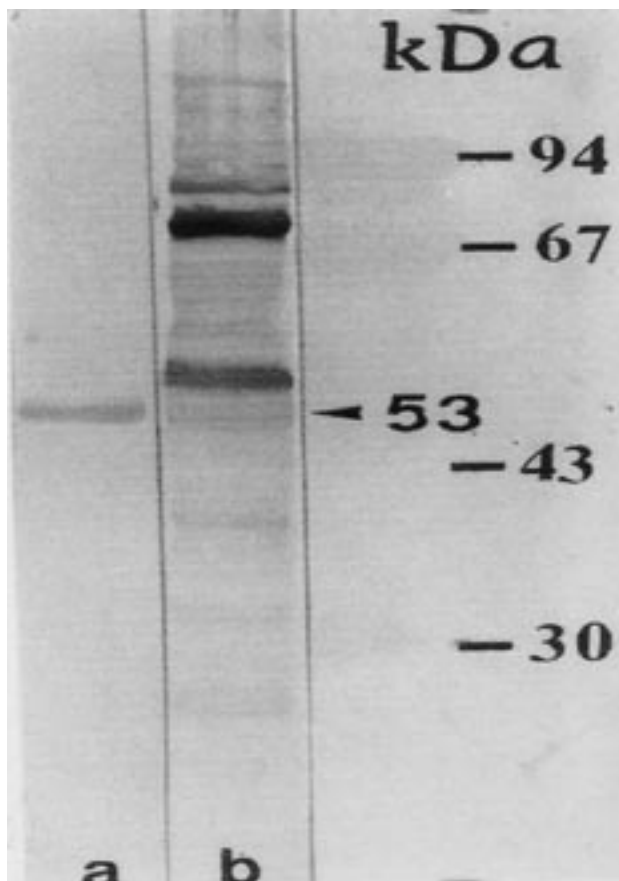


FIGURA 2 – WB. a) Reatividade do Acmo 56G (ascite) com AgC de *S. mutans*; b) Reatividade do soro de camundongo imunizado com *S. mutans* para AgC de *S. mutans*.

O fluido ascítico 56G foi testado no WB com AgC e AgSu (Figura 3). No AgC o Acmo 56G reagiu com a banda de 53 kDa e com o AgSu, três componentes de alto peso molecular foram reconhecidos, em especial, um polipeptídeo de 155 kDa (Figura 3-b).

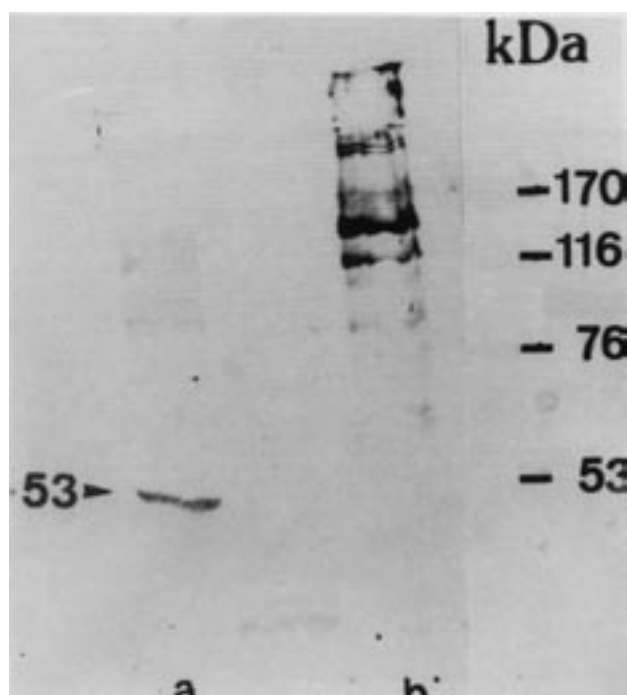


FIGURA 3 – WB. Reatividade do Acmo 56G para: a) AgC de *S. mutans* CCT 1910; b) AgSu de *S. mutans* CCT 1910.

Na cepa usada na imunização dos camundongos (*S. mutans* CCT 1910), o componente de 155kDa só foi evidenciado com a preparação de antígeno de superfície (AgSu), mas esta banda de 155kDa foi reconhecida pelo Acmo em células inteiras de *S. mutans* SP (Figura 4-b). A banda

de 53kDa marcada pelo Acmo 56G no AgC de *S. mutans* também foi encontrada em células inteiras das outras cepas de estreptococos, inclusive com *S. pyogenes* isolado em nosso laboratório, mas nenhuma reação foi encontrada com *S. pyogenes* T23 (CCT T23) (Figura 4).

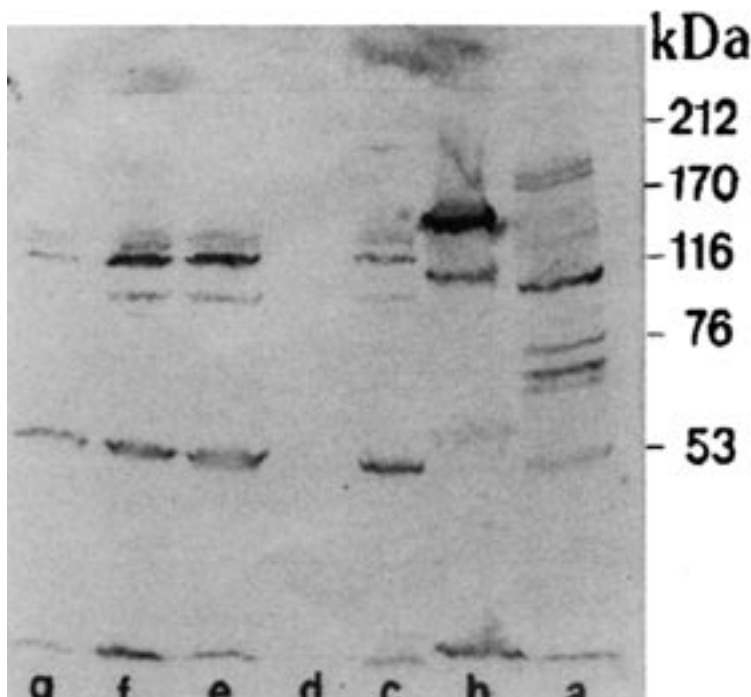


FIGURA 4 - WB. Reatividade do Acmo 56G com células inteiras de diferentes cepas de estreptococos: a) *S. mutans* CCT 1910, b) *S. mutans* SP, c) *S. pyogenes**, d) *S. pyogenes* T23, e) *S. pyogenes* CCT 1500, f) *S. sobrinus* 28A; g) *S. salivarius* CCT 0365. (*isolado no laboratório de Microbiologia da FOSJC – UNESP).

DISCUSSÃO

O *S. mutans* é freqüentemente isolado da placa dentária humana, mas existem evidências genéticas de que muitas cepas, previamente denominadas *S. mutans*, constituem na realidade, várias espécies distintas^{7,13}. Atualmente os estreptococos do grupo mutans são classificados em: *S. mutans* sorotipos *c*, *e* e *f* (presentes em humanos), *S. sobrinus*, sorotipos *d* e *g* (em humanos), *S. cricetus*, sorotipo *a* (em humanos e animais), *S. ferus* (em ratos), *S. rattus*, sorotipo *b* (em humanos e roedores), *S. macacae* (macacos), *S. downei*, sorotipo *h* (macacos). No homem os mais comumente isolados são os sorotipos *c*, *e* e *f*, presentes em toda população do mundo e relacionados a todos os tipos de cáries dentárias¹².

Os Acmos 56G e 24A apresentaram reatividade em ELISA com células inteiras de três espécies de estreptococos (*S. mutans*, *S. salivarius* e *S. pyogenes*), resultados compatíveis com os de relatos de Krishna & Cunningham⁹ (1985), ao produzirem um Acmo para *S. pyogenes*, que apresentou reatividade cruzada com *S. mutans*, GS5, indicando a existência de epítomos homólogos nestas duas espécies. A reatividade dos anticorpos ou era menos restrita e de baixa intensidade,

como no caso de 24A, ou era bastante específica para *S. mutans*, como no caso de 56G.

Ambos anticorpos eram do isótipo IgG2b, resultado esperado, pois, Leão et al.¹⁰ (2000) já tinham demonstrado o aumento desta subclasse, e também de IgG2a, seguindo a imunização de camundongos com antígenos citoplasmáticos de *S. mutans*.

O Acmo 56G reagiu com AgC de *S. mutans* no WB, identificando a banda de 53kDa, determinando a especificidade desse Acmo. O soro de camundongo imunizado reagiu com vários componentes antigênicos, representados por várias bandas no WB, o que reforça o caráter monoclonal do 56G e a possibilidade de uma utilização do mesmo numa identificação presumida rápida de *S. mutans* em amostras humanas.

Os antígenos de *S. mutans* mais importantes são as glicosiltransferases (GTF), que convertem a sacarose em dextranos sendo importantes na aderência de *S. mutans* à superfície dos dentes, e o antígeno denominado I/II^{17,19}, uma proteína que atuaria como uma adesina permitindo a ligação inicial de *S. mutans* à película salivar presente na superfície dentária. A imunização com GTF e com antígeno I/II diminui em animais o desenvolvimento da cárie dentária em animais³.

*Isolado no laboratório de Microbiologia da FOSJC.

A banda de 53 kDa marcada pelo anticorpo 56G no antígeno citoplasmático de *S. mutans* (Figura 2) também foi encontrada em células inteiras (Figura 4). Nesta preparação antigênica, outros componentes de pesos moleculares mais elevados, foram identificados como a fração de 116 e de 155 kDa, principalmente a banda de 155kDa reconhecida em *S. mutans* SP, mas com a cepa utilizada na imunização dos camundongos (*S. mutans* CCT 1910), o componente de 155kDa só foi evidenciado com a preparação de antígeno de superfície (AgSu), demonstrado na Figura 3, sugerindo que os diferentes isolados possuem quantidades variáveis desse componente.

A identidade exata dos componentes reconhecidos não pode ser totalmente esclarecida. O componente de 53 kDa tem um peso molecular próximo ao antígeno II que segundo Russel¹⁵ (1980), tem cerca de 48 kDa e esta fração é estável a temperatura e a proteólise, características compatíveis com o antígeno de 53 kDa deste trabalho. Quanto ao componente de 155 kDa existe uma suspeita de tratar-se da enzima GTF, pois seu peso molecular coincide com o da enzima (155 kDa). Se essa sugestão for verdadeira, o que poderá ser confirmado ao testar em paralelo um anticorpo monoclonal específico para GTF, o polipeptídeo de 53 kDa e outros polipeptídeos, de pesos moleculares intermediários, também observados no WB (116 kDa) poderão ser fragmentos peptídicos da molécula GTF.

A reatividade cruzada de 56G, no WB, com *S. pyogenes* isolado de um caso clínico de faringite estreptocócica na FOSJC (Figura 4-c) e com *S. pyogenes* CCT 1500 (Figura 4-e) foi encontrada ao se visualizar a banda de 53kDa. Todavia, este dado deverá ser confirmado, pois nenhuma reação foi vista com uma cepa padrão (TCC T23) da mesma espécie (Figura 4-d). A reatividade entre *S. mutans* e *S. pyogenes* também tem sido relatada na literatura⁶. Ela foi considerada por alguns autores como um fator aditivo no desenvolvi-

mento da febre reumática, pois *S. mutans* e *S. pyogenes* apresentam antígenos semelhantes na superfície celular e *S. mutans* alcançando a circulação sanguínea após procedimentos odontológicos, serviria como um estímulo antigênico constante para a produção de anticorpos de reação cruzada com coração atuantes no desenvolvimento da febre reumática⁶. Esse compartilhamento de antígenos entre ambas espécies foi reforçado nesse trabalho, já que Acmo anti-*S. mutans* reconheceu epítopos superficiais em *S. pyogenes*. Antígenos comuns são de ocorrência frequente dentro de um gênero bacteriano, tornando difícil a tarefa de encontrar anticorpos monoclonais espécie-específicos. Além disso, não podemos esquecer que ao longo da evolução muitas proteínas estruturais foram conservadas, guardando grande homologia estrutural entre si. Para exemplificar a proteína tropomiosina (35kDa) já foi caracterizada em crustáceos, sendo homóloga a de mamíferos e considerada um importante alérgeno humano⁴.

Os anticorpos monoclonais isolados neste trabalho precisam ser mais estudados para que se determine com certeza o antígeno alvo de *S. mutans* marcado por eles. Dessa maneira, tais anticorpos, principalmente 56G, poderão ser utilizados como identificadores de *S. mutans* em amostras biológicas humanas, servindo como uma ferramenta de estudo muito interessante.

CONCLUSÃO

Os 56G e 24A reagiram, em ELISA, com células inteiras de *S. mutans* e pertenciam ao isótipo IgG 2b. O nível de reatividade do Acmo 24A foi similar entre as espécies *S. mutans*, *S. pyogenes* e *S. salivarius*. O Acmo 56G reagiu mais intensamente com *S. mutans*, sendo mais específico. No WB com AgC o Acmo 56G reconheceu uma banda de peso molecular 53 kDa e no AgSu, um componente de 155 kDa. No WB com células inteiras de estreptococos foram demonstrados outros polipeptídeos como o de 116 kDa.

ABSTRACT

In this study was evaluated two (24A and 56G) anti-Streptococcus mutans monoclonal antibodies (Acmo) reactivity, in ELISA and Western blot, in relation of oral streptococci strains (S. salivarius, S. mutans and S. pyogenes). The Acmo were generated in the Laboratory of Microbiology and Immunology of Dental School of Dentistry – São José dos Campos, Brazil-UNESP. The antibodies IgG2b were purified in A-protein. Acmo 56G showed to be the most reactive with S. Mutans. In Western Blot (WB) with S.mutans cytoplasmic antigen (AgC), this Acmo showed only a band of 53kDa and with the surface antigen (AgSu) and whole cells 56G reacted with components of higher molecular weights, as 116 and 155 kDa. Crossed reactivity of Acmo 56G was detected, in WB, with other oral streptococci (S. pyogenes, S. salivarius, S. sobrinus), proving the sharing of antigens among this tested species, and can be an important factor in the development of diseases, as the rheumatic fever.

UNITERMS

Antibodies, monoclonal ; Streptococcus mutans; in vivo, animal

REFERÊNCIAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Revinter; 1998.
2. Bradford M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 May.; 7(72):248 – 54.
3. Chia JS. Inhibition of glucosyltransferase actives of Streptococcus mutans by a monoclonal antibody to a subsequence peptide. Infect Immun. 1993 Nov.; 61(11): 4689-95.
4. Daul CB. Identification of the major brown shrimp (Penacus azticus) allergen as the muscle protein tropomyosin. Int Arch Allergy Immunol. 1994; 103: 49-55.
5. Goding JW. Antibody production by hibridomas. J Immunol Methods. 1980 Aug.; 39(4): 285-308.
6. Hirota K. Cross-reactivity between human sialyl LewisX oligosaccharide and common causative oral bacteria of infective endocardites. FEMS Immunol Med Microbiol. 1995; 12(2): 159-64.
7. Jorge AOC. Microbiologia Bucal. São Paulo: Santos; 1998.
8. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975 Aug.; 256(7):495-7.
9. Krishner K, Cunningham MW. Myosin: a link between streptococci and heart. Science. 1985; 227(4685): 413-5.
10. Leão MVP, Brandão AAH, Moraes E, Shimizu MT, Unterkircher CS. Detecção de anticorpo anticoracção em camundongos Balb/c imunizados com Streptococcus mutans. Pesq Odontol Bras. 2000 out./dez.; 14(4): 319-26.
11. Ma JKC. The caries vaccine: a growing prospect. Dent Update. 1999 Nov.; 26(9): 374-80.
12. Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MPA. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12-to 30-month- old children. J Dent Res. 2000; 79(6):1371-7.
13. Nisengard RJ, Newman MG. Microbiologia oral e imunologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.
14. Roitt I, Brostoff J, Male D. Imunologia. São Paulo: Manole; 1999.
15. Russel MW. Protein antigens of Streptococcus mutans: purification and properties of a double antigen and its protease-resistant component. Infect Immun. 1980 May.; 28(2): 486-93.
16. Scroferneker ML, Pohlmann PR. Imunologia Básica e aplicada. Porto Alegre: Sagra Luzato; 1998.
17. Tomita Y. Evaluation of three individual glucosyltransferases produced by Streptococcus mutans using monoclonal antibodies. FEMS Microbiol Lett. 1996; 145(3):427-32.
18. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Eletrophoretic transfer of proteins from poliacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA. 1979 Sept.; 76(9): 4350-4.
19. Van Raamsdonk. Effect of antibodies on the chain length and growth of streptococcus mutans. Caries Res. 1997; 31(1):35-40.

Recebido em:29/04/2005

Aprovado em: 05/01/2006

Antonio Carlos Victor Canettieri
Av. Salmão, 472 – Apto 112 Parque Residencial Aquarius
12246-260 - São José dos Campos - SP
acanettieri@directnet.com.br