

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IVANA FROEDE NEIVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BIOSOROTIPOS SELVAGENS
DE *Streptococcus mutans* ISOLADOS DE CRIANÇAS COM
DIFERENTES HISTÓRICOS DA DOENÇA CÁRIE**

CURITIBA

2007

IVANA FROEDE NEIVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BIOSOROTIPOS SELVAGENS
DE *Streptococcus mutans* ISOLADOS DE CRIANÇAS COM
DIFERENTES HISTÓRICOS DA DOENÇA CÁRIE**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, área de concentração: Saúde humana, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção de título de Doutor em Processos Biotecnológicos.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Vânia Aparecida Vicente.

CURITIBA

2007

TERMO DE APROVAÇÃO

IVANA FROEDE NEIVA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BIOSOROTIPOS SELVAGENS DE *Streptococcus mutans* ISOLADOS DE CRIANÇAS COM DIFERENTES HISTÓRICOS DA DOENÇA CÁRIE

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, área de concentração: Saúde humana, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vânia Aparecida Vicente
Departamento de Patologia Básica - UFPR

Prof^a. Dr^a. Lygia Vitória G. Terasawa
Departamento de Genética - UFPR

Prof^a. Dr^a. Patrícia R. Dalzoto
Departamento de Patologia Básica - UFPR

Prof. Dr. Ricardo L. R. Souza
Departamento de Genética - UFPR

Prof^a. Dr^a. Marina Ribas
Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUC-PR

Curitiba, 20 de dezembro de 2007

DEDICATÓRIA

Dedico,

*A quem tudo pertence: "Deus" que sempre esteve do meu lado ... e
aos meus familiares; em especial meus pais: Ciro e Vera;
meu esposo, Ricardo e
meu filho, João Gabriel.*

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que fazem da docência e da pesquisa um caminho sem volta de dedicação, trabalho, esforço e perseverança, muitas vezes com sacrifícios de suas vidas pessoais, passando por dificuldades e adversidades em muitos aspectos, mas sempre dando o melhor de si aos seus aprendizes, com dignidade, competência, amor e respeito. O meu muito obrigado!!

A todos aqueles que um dia foram meus alunos e aos que ainda são, por darem sentido a todo tempo que vivi dedicando-me ao ensino e docência. Foi graças a vocês, pela confiança, carinho e apoio que me deram, que obtive motivação durante todo o período de elaboração deste trabalho.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Vânia Aparecida Vicente, por dar-me a oportunidade de tamanho aprendizado em seu laboratório, pela paciência, disponibilidade e carinho dedicado a este trabalho, pela amizade, pelo companheirismo, pelos conselhos..., por tudo!!! Obrigado.

À Prof^a Débora do Rocio Klisiowicz pela disponibilidade, paciência e apoio nas análises das seqüências, apesar do nosso pouco tempo de convivência já deu para perceber que é uma pessoa determinada, dedicada, disciplinada e muito especial, o meu muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, Coordenador, pela dedicação ao programa de pós-graduação.

À minha colega de disciplina Vânia Suely Maria, exemplo de compromisso com a docência, pela amizade e convivência científica compartilhada.

Aos queridos amigos que fiz nos laboratórios por onde passei, sem os quais não teria conseguido: Dicezar, Dicler, Mônica, Yanê, Julianas, Izadora, Rafael, Paulo, alunos do projeto de extensão, minha eterna gratidão pelo carinho, disposição, colaboração, apoio científico, técnico e emocional que me dedicaram. Vocês permanecerão para sempre na minha lembrança e em meu coração!

A todos os funcionários da UFPR, da diretoria à biblioteca, passando por todos os departamentos, meus agradecimentos pelo apoio, colaboração, paciência e amizade nestes dez anos de convívio carinhoso!

Às minhas grandes amigas Débora, Maristela, Ruth, Espéria, Márcia e ao meu grupo de oração (célula), por tornarem minha vida mais doce nos momentos mais amargos. Sou feliz por tê-los sempre por perto.

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, pela amizade e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Walter Boerguer e equipe, pela disponibilidade e acolhimento no laboratório de Ecologia Molecular, além, é claro, dos inúmeros empréstimos de material e equipamentos, o meu eterno obrigado!

Ao Laboratório Mutidisciplinar de Biologia Molecular do Departamento de Botânica, sob a responsabilidade da Prof^a Elide Pereira dos Santos, o meu muito obrigado pela disponibilidade e empréstimos dos equipamentos.

Aos voluntários que, com todo desprendimento e disponibilidade, se dispuseram a participar com seriedade e dedicação deste estudo. Sem vocês este trabalho não seria possível.

Ao meu Departamento Odontologia Restauradora pela ajuda de custo na aquisição de material para desenvolvimento deste trabalho, bem como a CAPES e ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos: Obrigado pelo apoio.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 BIOFILME.....	18
2.2 SALIVA E PAPEL IMUNOLÓGICO DO HOSPEDEIRO.....	19
2.3 DIETA.....	21
2.4 CÁRIE.....	22
2.5 <i>Streptococcus mutans</i>	22
2.5.1 Caracterização Biológica de <i>S. mutans</i>	23
2.5.2 Fatores de Virulência.....	25
2.5.3 Colonização da Boca por <i>Streptococcus mutans</i>	27
2.5.3.1 Produção de polissacarídeos extracelulares por <i>S. mutans</i>	30
2.6. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>S. mutans</i>	35
2.6.1 Diversidade das Espécies de <i>Streptococcus</i> do Grupo Mutans.....	36
2.6.1.1 Avaliação da variabilidade genética do Grupo Mutans por meio de marcadores moleculares.....	37
2.6.2 Análise de Distância.....	43
2.7 RELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS DIETÉTICAS, CLÍNICAS E MICROBIOLÓGICAS E O DESENVOLVIMENTO DA CÁRIE DENTAL.....	48
2.8 DIVERGÊNCIAS QUANTO AOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>S. mutans</i>	49

3 OBJETIVOS	52
4 MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO	53
4.2 CASUÍSTICA.....	53
4.3 EXAME CLÍNICO	54
4.4 ESTERILIZAÇÃO	54
4.5 MEIOS DE CULTURA.....	54
4.5.1 Ágar Mitis Salivarius Sacarosado com Bacitracina e Telurito de Potássio (AMSB)	54
4.5.2 Ágar Sangue (Merck).....	55
4.5.3 Caldo BHI (Infusão de Cérebro e Coração) (Newprov)	55
4.5.4 Meio Todd – Hewit (Merck).....	55
4.6 SOLUÇÕES E REAGENTES	55
4.6.1 Solução Salina.....	55
4.6.2 Água Peptonada	56
4.6.3 DNA Polimerase (Invitrogen)	56
4.6.4 dNTP (Invitrogen)	56
4.6.5 EDTA 0,5M	56
4.6.6 Gel de Agarose (0,8%)	57
4.6.7 Gel de Agarose (1,6%)	57
4.6.8 Oligonucleotídeos iniciadores (<i>Primers</i>)	57
4.6.9 Tampão da Amostra	57
4.6.10 Tampão CTAB.....	57
4.6.11 Tampão de Corrida para Gel de Agarose (TEB 10X – pH 8,0).....	58
4.6.12 Tampão Tris-EDTA (TE).....	58
4.6.13 Solução de Brometo de Etídio	58

4.7 COLETAS SALIVARES.....	58
4.8 ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ESTIMATIVA DE <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i> NA SALIVA.....	58
4.8.1 Provas Bioquímicas para Identificação de <i>S. mutans</i>	59
4.8.1.1 Prova da catalase	60
4.8.1.2 Prova da fermentação do Sorbitol e Manitol	60
4.8.1.3 Prova da Hidrólise da Esculina	60
4.8.1.4 Prova da Hidrólise da Arginina	60
4.9 ESTOQUE.....	60
4.10 EXTRAÇÃO DE DNA.....	61
4.11 VARIABILIDADE GENÉTICA POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES	62
4.11.1 Amplificação do DNA por RAPD.....	62
4.11.2 Eletroforese	62
4.11.3 Análise da Variabilidade Genética	63
4.12 REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO	63
4.12.1 Reação de Sequenciamento da Região Intergênica (16S-23S)	64
4.12.2 Reação de Sequenciamento do Gene da gtf-B	65
4.12.3 Análise das Seqüências da Região Intergênica (16S-23S) e gtf-B.....	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE <i>S. mutans</i>	66
5.2 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS.....	70
5.2.1 Caracterização Molecular dos Isolados de <i>S. mutans</i> por Meio de Marcadores Moleculares RAPD	71
5.2.2 Sequenciamento da Região Intergênica 16S-23S.....	75
5.2.3 Sequenciamento Parcial do Gene que Codifica a Enzima Glicosiltransferase (GTF).....	78

6 CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICES	103
APÊNDICE 1 - AVALIAÇÃO DA DIETA E COLONIZAÇÃO SALIVAR DE <i>S. mutans</i> EM CRIANÇAS COM DIFERENTES HISTÓRICOS DA DOENÇA CÁRIE.....	104
APÊNDICE 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	105
APÊNDICE 3 - FICHA DE ANAMNESE E EXAME CLÍNICO.....	106
APÊNDICE 4 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	107
APÊNDICE 5 - ACEITE DE TRABALHOS	108
APÊNDICE 6 - TRABALHO PARA FUTURA PUBLICAÇÃO	109
ANEXOS	110
ANEXO 1 - SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DO GENE <i>gtf-B</i> DOS ISOLADOS ANALISADOS	111
ANEXO 2 - PORCENTAGEM DE AMINOÁCIDOS PARA O GENE <i>gtf-B</i> DO <i>S. mutans</i> ANALISADO E DAS LINHAGENS DE REFERÊNCIAS PUBLICADAS NO "GENBANK"	113
ANEXO 3 - SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DA REGIÃO INTERGÊNICA DOS ISOLADOS ANALISADOS	114
ANEXO 4 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA REGIÃO INTERGÊNICA AMPLIFICADA PELO PAR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS	120

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - BIOFILME DENTAL EM SUPERFÍCIE LISA DO ESMALTE DENTÁRIO.....	19
FIGURA 2 - MACRO E MICRO MORFOLOGIA DE COLÔNIAS DE <i>Streptococcus mutans</i>	23
FIGURA 3 - ESTRUTURA PRIMÁRIA DAS ENZIMAS GTFs EXPRESSAS POR <i>S. mutans</i>	32
FIGURA 4 - VARIAÇÃO MACROMORFOLÓGICA DE <i>S. mutans</i> EM AMSB	67
FIGURA 5 - MARCADORES RAPD DAS AMOSTRAS DE DNA DE <i>S. mutans</i> ISOLADOS DAS CRIANÇAS, UTILIZANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR OPA 5 (Operon Technologies)	71
FIGURA 6 - DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DE SIMILARIDADE GENÉTICA OBTIDA POR MARCADORES RAPD DOS ISOLADOS, UTILIZANDO-SE O COEFICIENTE DE JACCARD E MÉTODO DE AGRUPAMENTO UPGMA.....	72
FIGURA 7 - ANÁLISE TRIDIMENSIONAL DOS ISOLADOS DE <i>S. mutans</i>	75
FIGURA 8 - PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA DE <i>S. mutans</i> ISOLADOS DAS CRIANÇAS, UTILIZANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR DA REGIÃO INTERGÊNICA (CHEN <i>et al.</i> , 2004).....	76
FIGURA 9 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>S. mutans</i> PROCEDENTES DE AMOSTRAS SALIVARES DE CRIANÇAS COM DIFERENTES HISTÓRICOS DE CÁRIE	78
FIGURA 10 - PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA DOS ISOLADOS DE <i>S. mutans</i> PROVENIENTES DAS CRIANÇAS, UTILIZANDO OS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES QUE FLANQUEIAM A REGIÃO ESPECÍFICA DA GTF-B DA ENZIMA GLIGOSILTRANSFERASE (OHO <i>et al.</i> , 2000).....	79
FIGURA 11 - DISTÂNCIAS NUCLEOTÍDICAS BASEADAS NA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS PARCIAIS DA REGIÃO GTF-B DOS ISOLADOS E LINHAGEM REFERÊNCIA DE <i>Streptococcus mutans</i>	82
FIGURA 12 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE ISOLADOS DE <i>S. mutans</i> PROCEDENTES DE CRIANÇAS COM DIFERENTES HISTÓRICOS DE CÁRIE	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CARACTERÍSTICAS DIFERENCIAIS DAS ESPÉCIES DE ESTREPTOCOCOS DO "GRUPO MUTANS", OS SOROTIPOS E A PRINCIPAL FONTE DE ISOLAMENTO.....	24
TABELA 2 -	ENZIMAS GLICOSILTRANSFERASES (GTF) EXPRESSAS POR <i>Streptococcus mutans</i>	31
TABELA 3 -	CARACTERÍSTICAS DIFERENCIAIS DAS ESPÉCIES DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS, BASEADO EM PROVAS BIOQUÍMICAS E DE SENSIBILIDADE À BACITRACINA.....	59
TABELA 4 -	SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....	62
TABELA 5 -	AVALIAÇÃO DA DIETA E COLONIZAÇÃO SALIVAR DE <i>S. mutans</i> EM CRIANÇAS COM DIFERENTES HISTÓRICOS DA DOENÇA CÁRIE	68
TABELA 6 -	PORCENTAGEM DE BASES NUCLEOTÍDICAS E LONGITUDE PARA O FRAGMENTO INTERGÊNICO (16S-23S) DAS AMOSTRAS DE <i>S. mutans</i> ESTUDADAS.....	77
TABELA 7 -	PORCENTAGEM DE BASES NUCLEOTÍDICAS E LONGITUDE PARA O FRAGMENTO GTF-B DOS ISOLADOS E LINHAGENS REFERÊNCIAS DE <i>S. mutans</i> E DAS SEQÜÊNCIAS PUBLICADAS NO "GENBANK"	80
TABELA 8 -	DIFERENÇAS NUCLEOTÍDICAS PARA O GENE <i>gtf-B</i> ENTRE OS ISOLADOS DE <i>S. mutans</i> E AS LINHAGENS REFERÊNCIAS UTILIZADAS (FUJIWARA <i>et al.</i> , 1998).....	81
TABELA 9 -	DIFERENÇAS AMINOACÍDICAS PARA O GENE <i>gtf-B</i> ENTRE OS ISOLADOS DE <i>S. mutans</i> E AS LINHAGENS REFERÊNCIAS UTILIZADAS (FUJIWARA <i>et al.</i> , 1998).....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	- aminoácido
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i> .
BLAST	- programa do <i>GenBank</i> para análise de seqüências.
BOOTSTRAP	- teste de confiabilidade.
pb	- pares de base.
C	- citosina.
CIA	- clorofórmio-álcool isoamílico
FORWARD	- sentido 3' do DNA.
G	- Guanina.
G(+)	- Gram-positivo.
G(-)	- Gram-negativo.
GC	- relação entre Guanina e Citosina.
GTF	- Glicosiltransferase
ITS	- sequenciamento de regiões intergênicas 16S-23S
J	- coeficiente de Jaccard.
dNTP	- dinucleotídeo fosfato.
OPA	- Operon A.
PCR	- reação de polimerização em cadeia (<i>Polimerase Chain Reaction</i>).
PRIMER	- Oligonucleotídeo iniciador.
RAPD	- amplificação de DNA polimórfico ao acaso (<i>Radom Amplified Polymorphic DNA</i>).
REA	- análise por enzima de restrição.
REVERSE	- sentido 5' do DNA.
T	- Timina.
Taq	- enzim DNA Polimerase do <i>Termophylus aqu</i> nucleotídeos.
TE	- Tris-EDTA.
Tm	- melting temperature – temperatura em que 50% do DNA está hibridizado.
UPGMA	- algoritmo usado para análise de DNA.
+, ++, +++	- número de cruces que estima a intensidade do biofilme.

RESUMO

Amostras de *Streptococcus* do grupo Mutans provenientes da saliva de crianças de baixa renda, com diferentes históricos da doença cárie foram isoladas em *Agar Mitis Salivarius* e purificadas, obtendo 44 isolados de *S. mutans*, caracterizados por meio de marcadores morfológicos e bioquímicos. O DNA genômico dos isolados foi extraído utilizando CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) associado a sonicação. A variabilidade genética dos isolados foi estudada por meio de marcadores RAPD utilizando os oligonucleotídeos iniciadores OPA2, OPA3, OPA5, OPA8, OPA9 E OPA13. O software “NTSYS” foi utilizado para análise do polimorfismo usando o coeficiente de Jaccard e o método “UPGMA” para construção de dendrogramas. A consistência dos agrupamentos foi avaliada por *bootstrap* usando o “winboot” software. Os dados revelaram grande variabilidade entre os isolados de *S. mutans*, considerando-se sua procedência e dados clínicos em diferentes grupos de crianças. O sequenciamento da região intergênica 16S-23S e do gene que codifica Glicosiltransferase B (gtf-B) foi realizado com o objetivo de estabelecer um padrão molecular de diferenciação dos isolados com diferentes padrões de virulência. A análise molecular da região intergênica revelou similaridades entre os isolados seqüenciados, o que demonstra que todos devam pertencer a mesma espécie. Já a análise do gtf-B revelou cinco genótipos diferentes, quando comparados com seqüências publicadas do mesmo gene no “Genbank” indicando a existência de variedades dentro da espécie.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*; Criança; Cárie; Extração de DNA; Polimorfismo Genético.

ABSTRACT

Samples from the *Streptococcus* group obtained from saliva of low income background children with different history of tooth decay, were isolated and purified in Agar Mitis Salivarius, in order to obtain 44 samples of *S. mutans*, which were characterized by using morphological and biochemical identification. The genomic DNA from the extracted by the method of CTAB (Cetil-methyltetra amonium), associated to the sonication, was analysed by the RAPD method using the primers OPA2, OPA3, OPA5, OPA8, OPA9 and OPA13. The software "NTSYS" was applied for polymorphism analysis, using the Jaccard coefficient and the "UPGMA" method for construction of dendograms. The consistency of different groups was evaluated by boodstrap using the "winboot" software. The data revealed a wide variability among the isolated of the *Streptococcus mutans*, considering their origin and the clinical data in various children's group. The sequency of the intergenic region and the Glicosiltransferase B (gtf-B) was performed in order to establish a molecular pattern of the strain with different virulences. The molecular analysis of the intergenic region, revealed similarities among the isolated, which showed that they were from the same species. However the gtf-B analysis demonstrated five different genotypes when compared with sequencies from the "Genbank", pointing to the existence of variations into the same species.

Key words: *Streptococcus mutans*; Children; Cárie; DNA Extraction; Genetic Polymorphism.

1 INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença infecciosa e transmissível, de origem microbiana, associada à presença bacteriana na colonização de superfícies dentais. Devido à sua natureza multifatorial e origem microbiana, pode variar de intensidade e prevalência de acordo com as condições endógenas de cada hospedeiro (LOESCHE, 1986; BABIERI, 2005; MOREIRA, 2006).

Muitos estudos têm demonstrado que o *Streptococcus mutans* está associado com a cárie em seres humanos e que há uma correlação entre o número de *S. mutans* presente na saliva, a manifestação clínica da doença e o risco ao desenvolvimento da doença (BRATTHALL, 1992; MATTOS-GRANER, 1999; SMITH *et al.*, 1998; BEIGHTON, 2005; WAN *et al.*, 2003). *S. mutans* é amplamente distribuído, não apenas em populações de moderada ou alta incidência de cárie (ZICKERT *et al.*, 1982; BEIGTON *et al.*, 1987), como também em populações que não apresentam ou têm baixo índice da doença (CARLSSON *et al.*, 1985; MATEE *et al.*, 1993), mostrando que a simples colonização por estes microrganismos não implica no desenvolvimento de cárie (BRATTHALL, 1992; BEIGHTON, 2005). Fatores endógenos do hospedeiro, como o fluxo e a capacidade tampão da saliva, presença de imunoglobulinas salivares, bem como os fatores exógenos, como dieta e higiene bucal, estariam interagindo para o estabelecimento da doença, evidenciando a natureza multifatorial desta.

Durante seu processo evolutivo, *S. mutans* desenvolveu fatores que determinam sua cariogenicidade ou virulência, como o sistema enzimático para o metabolismo da sacarose, substância mais cariogênica consumida pelos seres humanos (KOGA *et al.*, 1995). *S. mutans* é considerado um microrganismo cariogênico para todas as espécies de animais dentados até hoje testadas. Atualmente, foi demonstrado que induz cárie quando implantado em modelos animais experimentais. Observa-se, entretanto, que cáries obtidas com a participação de *S. mutans* e da microbiota normal da boca são mais extensas e freqüentes do que só com *S. mutans*, demonstrando assim, a participação efetiva da microbiota bucal na etiologia da doença (BRATTHALL e CARLSON, 1988; KOGA *et al.*, 1995).

O *S. mutans* apresenta características fisiológicas e morfológicas que o tornam o microrganismo de maior cariogenicidade da microbiota bucal. Além de possuir várias estruturas que facilitam a aderência, como glicocálice e fímbrias, apresentam também enzimas, como a glicosiltransferase e a frutossiltransferase, capazes de converter moléculas de açúcares, como a sacarose, em polímeros extracelulares. Estes são responsáveis pela aderência desse microrganismo às superfícies dentárias e propicia a agregação deste com outros microrganismos na boca. Além disso, este agente realiza a síntese de polímeros intracelulares pelos sistemas enzimáticos permease e revertase, que garantem o armazenamento de energia para ser utilizada em condições de inanição no ambiente bucal e em situações metabólicas específicas próprias, como aquelas de oxidoredução extrema do biofilme dental. A partir do conhecimento dessas características próprias de *S. mutans*, é importante ressaltar o reconhecimento da existência de biosorotipos variáveis de bactérias com tais características biológicas na saliva humana (OHO *et al.*, 2000; GRONROOS e ALALUUSUA, 2000).

Marcadores moleculares têm esclarecido a variabilidade genética existente entre isolados de *S. mutans* provenientes da saliva e de outras fontes. A técnica de PCR (reação de polimerização em cadeia) têm sido utilizada na identificação dos diferentes biosorotipos do grupo mutans, permitindo, assim, a estimativa da frequência destes agentes na microbiota bucal (OHO *et al.*, 2000; GRONROOS e ALALUUSUA, 2000; MARCHANT *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2001; IGARASHI *et al.*, 2001; OKADA *et al.*, 2002). Marcadores RAPD (Amplificação de DNA polimórfico ao acaso) têm sido utilizados no estudo do polimorfismo e distribuição de populações de *S. mutans* da boca e biofilme dental (CAULFIELD e WALKER, 1989; SAARELA *et al.*, 1993; SAARELA *et al.* 1996; LI e CAUFIELD, 1998; TRUONG *et al.*, 2000; EMANUELSSON, 2001; GONÇALVES *et al.*, 2002; KAMIYA, 2003; KLEIN *et al.*, 2004; NAPIMOGA *et al.*, 2004). Seqüências ITS (Sequenciamento de regiões intergênicas 16S - 23S) do DNAr têm sido utilizadas para identificar *Streptococcus* como membros de uma espécie ou grupo ou classificá-los em novas espécies. O sequenciamento parcial do gene da enzima GTF (Glicosiltransferase) tem sido utilizado para avaliar a sua atividade enzimática, verificando, assim, a sua virulência. (FUJIWARA *et al.*, 1998).

Sendo assim durante este trabalho foi avaliado o polimorfismo dos biótipos selvagens de *S. mutans*, isolados de crianças com diferentes históricos de cárie, por meio de marcadores RAPD. Os isolados separados em grupos através do RAPD, foram identificados por meio de seqüências de regiões intergênicas (16S-23S) e diferenciados através das seqüências de regiões específicas do gene da enzima glicosiltransferase (gtf-B).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A associação microbiota, dieta, e hospedeiro associada ao tempo desempenha um papel importante no desenvolvimento da doença cárie, sendo que o hospedeiro é naturalmente mais suscetível de acordo com a idade, higiene e dieta.

2.1 BIOFILME

Segundo Leite *et al.* (2001), o termo biofilme é empregado para designar comunidades de microrganismos aderidas sobre uma superfície e sob a ação contínua de um fluxo salivar.

A formação do biofilme dental é a etapa inicial no desenvolvimento da doença cárie, assim como de infecções periodontais, e ocorre em duas fases distintas. Durante a primeira fase, bactérias que possuem carga negativa podem alcançar, por energia cinética, uma superfície natural que também possui carga negativa. Além disso, a própria morfologia de *S. mutans* associada à presença de *Actinomyces naslundii* e *Candida albicans* potencializam a virulência desta bactéria (BARBIERI, 2005). Na segunda fase, o biofilme acumula bactérias por coagregação com a mesma espécie ou com outras espécies, utilizando mecanismos e estruturas como glicocálice, adesinas, fímbria, além da produção de matriz polissacarídica extracelular (JORGE, 1998; KOLENBRANDER, 2000).

O ciclo de desenvolvimento do biofilme pode ser resumido em quatro fases: iniciação, maturação, manutenção e dissolução. A plasticidade fenotípica permite que bactérias se adaptem às alterações impostas pelo meio ambiente ao qual estão submetidas. A transição entre um estado e outro é feita de maneira controlada e é altamente complexa sob o ponto de vista fisiológico, bioquímico e molecular (O' TOOLE, KAPLAN, KOLTER, 2000).

Os biofilmes podem ser formados por uma única ou por diferentes espécies de microrganismos. No seu processo de formação, uma comunidade microbiana multiespécies, com um patógeno predominante, interage com o hospedeiro, dividindo espaço e recursos disponíveis com outros organismos oportunistas (LEITE *et al.*, 2001)

O biofilme garante a vida da colônia em ambientes não estáveis, com fluxo

constante de líquidos. Pode-se atribuir ao biofilme uma série de vantagens para a colônia, como melhor comunicação entre células, em função da solução de continuidade entre elas, facilitando as atividades bioquímicas, melhor proliferação, acesso a nichos e recursos que não poderiam ser utilizados por células isoladas e a defesa coletiva contra fatores antagônicos (LEITE *et al.*, 2001).

A formação do biofilme na superfície dental é um fenômeno complexo, e possivelmente a chave para o esclarecimento das patologias bucais de origem bacteriana. O entendimento preciso da formação e virulência desse biofilme em função do tempo, dos fatores imunológicos, dos fatores microbianos, entre outros, tem sido investigado por muitos autores, e vem sendo gradativamente esclarecido (MONTANARO *et al.*, 2004).

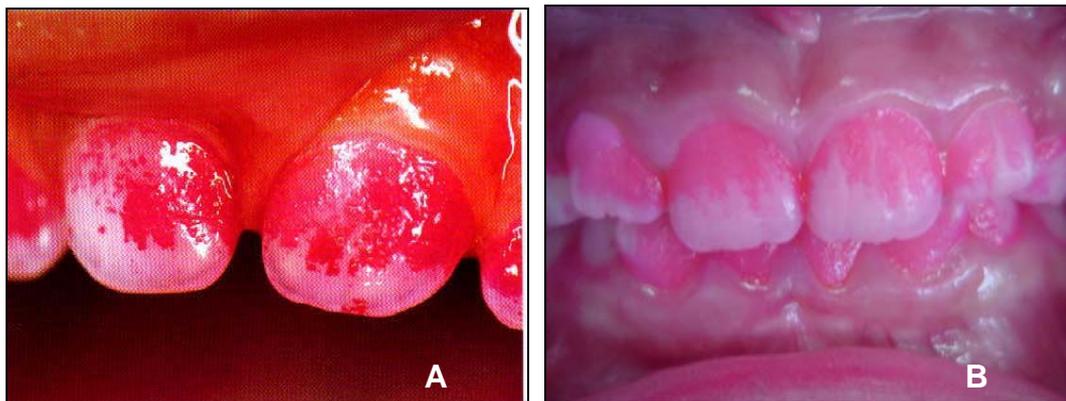


FIGURA 1 - BIOFILME DENTAL EM SUPERFÍCIE LISA DO ESMALTE DENTÁRIO

FONTE: O autor

Legenda: Coloração com fuscina básica em dentes decíduos (A) em dentes permanentes (B)

2.2 SALIVA E PAPEL IMUNOLÓGICO DO HOSPEDEIRO

A saliva é uma mistura complexa de vários componentes, formada principalmente por secreções das glândulas salivares, mas também contém fluido gengival, células epiteliais descamadas, microrganismos, leucócitos, resíduos alimentares, sangue, entre outros componentes, sendo essencial para manutenção da saúde bucal. A saliva reveste a mucosa bucal e a protege contra irritação, forma reservatório de íons para a remineralização dentária, apresenta função de tamponamento de pH, ação antimicrobiana, participa da formação da película

adquirida e na digestão enzimática da amilase e, participa, ainda, das sensações gustativas, por sua ação solvente. Os componentes antimicrobianos da saliva incluem imunoglobulinas, lisozimas, lactoferrinas, peroxidases, amilases e proteínas aniônicas. Além disso, seus componentes orgânicos, especialmente as glicoproteínas, funcionam como nutrientes para os microrganismos bucais. As proteínas salivares podem ser degradadas por proteases produzidas, por exemplo, por *S. mutans* e *S. sanguis*. O conteúdo bacteriano da saliva é estimado em 10^9 bactérias por mL. A saliva ajuda a controlar a invasão da boca por microrganismos, sendo que, um fluxo salivar aumentado pode diminuir a concentração microbiana e a falta da mesma resulta em aumento do número de bactérias na microbiota bucal (TENOVUO, 1998).

Entre os fatores relacionados ao hospedeiro, são importantes os vários mecanismos antimicrobianos inespecíficos, os anticorpos imunoglobulinos inespecíficos e os anticorpos imunoglobulinas A (IgA) presentes na saliva, que funcionam como primeira linha de defesa contra diferentes agentes infecciosos (MARCOTTE e LAVOIE, 1998).

A imunoglobulina A (IgA) constitui anticorpo predominante nas secreções, incluindo a saliva. A IgA é considerada a primeira linha de defesa do hospedeiro frente aos patógenos que colonizam ou invadem superfícies banhadas pelas secreções. A principal função da IgA parece ser limitar a aderência, tal como a penetração de antígenos estranhos no interior da mucosa (AALTONEN *et al.*, 1990). Além disso, bactérias indígenas têm sido encontradas revestidas pela IgA (MARCOTTE e LAVOIE, 1998; KOLENBRANDER, 2000).

Nos últimos anos, acumularam-se evidências de que anticorpos, passivamente transferidos da mãe para a criança, via placenta ou pela amamentação, possam estimular primariamente os linfócitos, contribuindo para o desenvolvimento da imunidade ativa no neonato. Este fenômeno deve, portanto, influenciar a resposta de anticorpos para *S. mutans* nos primeiros anos de vida (HANNULA, 2000; MARCOTTE e LAVOIE, 1998).

2.3 DIETA

A dieta exerce um papel fundamental no desenvolvimento da doença cárie, mas, apesar disso, não pode ser considerada como principal fator causal, já que é bastante conhecida a natureza multifatorial da cárie dentária (CORRÊA, 1998; THEILADE e BIRKHED, 1988). Neste contexto, vale ressaltar que o efeito cariogênico causado pelo consumo de carboidratos da dieta pode ser modificado por outros fatores, como a capacidade tampão da saliva, ou seja, uma determinada dieta cariogênica pode implicar numa incidência de cárie que varia de indivíduo para indivíduo.

Os efeitos ou implicações locais de uma dieta cariogênica no metabolismo do biofilme, e especificamente na produção de ácidos, são importantes no processo cariioso. Entretanto, os efeitos sistêmicos no desenvolvimento de estruturas, tais como os dentes, podem influenciar na progressão da doença cárie (THEILADE e BIRKHED, 1988). Pode-se dizer que dieta é o efeito local dos alimentos, ou seja, seu papel e sua relação com os tecidos dentais. Já o efeito sistêmico que os diferentes nutrientes provenientes da alimentação ocasionam na saúde de maneira geral e no crescimento e desenvolvimento pode ser chamado de nutrição (KATZ, 1981).

De acordo com Corrêa, (1998) o aconselhamento dietético é fundamental, primeiramente pelo prisma da prevenção de cáries e também pelo fato de maus hábitos alimentares poderem levar à obesidade, uma pré-condição para outras doenças sistêmicas graves. Além disso, os hábitos alimentares incorretos aprendidos na infância são difíceis de serem modificados posteriormente.

Em torno dos trinta meses, a maioria das crianças já está com a dentadura decídua completa, e, ao mesmo tempo, os dentes permanentes estão em processo de formação e desenvolvimento. Por isso, nesta fase a dieta assume papel fundamental, tanto local como sistemicamente (SCHULMAN, 1981). Sistemicamente, a dieta deve oferecer a quantidade necessária de nutrientes para o desenvolvimento do organismo em geral, e em particular dos dentes que estão em formação. Como efeitos locais, tem-se os alimentos da dieta atuando diretamente nos elementos dentários, que por sua vez, já estão colonizados pelas bactérias cariogênicas, o que pode dar início ao processo cariioso.

2.4 CÁRIE

A cárie dental é uma das doenças infecciosas e transmissíveis mais prevalentes em humanos e uma das mais dispendiosas com relação ao tratamento sintomático restaurador (LOECHE, 1986). Além disso, o tratamento sintomático das lesões de cárie é ineficaz para o controle e eliminação desta doença e apresenta um custo extremamente elevado, sendo inviável sua aplicação em termos de saúde pública. Assim, é marcante a necessidade de instituição de medidas preventivas com o objetivo de controlar os fatores etiológicos da cárie dental (DEMERS *et al.*, 1990).

Os estreptococos do grupo mutans têm sido encontrados em praticamente todos os indivíduos com alta, baixa ou muito baixa prevalência de cárie (CARLSSON, OLSSON e BRATTHALL, 1985). Porém, a simples detecção destes microrganismos na saliva ou biofilme não justifica o desenvolvimento de cárie, devendo-se levar em consideração a concepção da natureza multifatorial da doença, a qual apresenta variações de acordo com as condições sócio-econômicas, culturais e ambientais de uma população (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001; BRATTHALL, 1992). Entre esses fatores destaca-se a dieta com alto teor de sacarose e a qualidade e frequência de higiene bucal como fundamentais para a ocorrência da cárie.

Sendo assim, a lesão cariosa é considerada a manifestação de um processo patológico que ocorre em consequência de uma interação entre bactérias presentes na boca, superfícies dentais e constituintes da dieta, especialmente a sacarose.

O consumo excessivo de carboidratos propicia meio adequado à formação de ácido pelo metabolismo microbiano, que pode levar a desmineralização do esmalte. Assim, a progressão da doença cárie depende de hospedeiro suscetível, microbiota patogênica e dieta rica em carboidratos, interagindo em condições críticas num determinado período de tempo (YAZAKI *et al.*, 1999; PETTI e HAUSEN, 2000).

2.5 *Streptococcus mutans*

Os estreptococos do grupo mutans foram isolados por Clarke, no início do século XX, em crianças inglesas, e descritos como estreptococos “mutantes”, visto que apresentavam morfologia celular mais achatada que outros estreptococos (MATTOS-GRANER, 1999).

Na década de 1960, o desenvolvimento de pesquisas com animais estimulou estudos a respeito da microbiologia da cárie dental, em que a bactéria *S. mutans* foi convincentemente conectada à etiologia da doença (HAMADA, 1986).

2.5.1 Caracterização Biológica de *S. mutans*

A bactéria *S. mutans* caracteriza-se por cocos Gram-positivos, com morfologia ovalada, medindo aproximadamente, 0,5 a 0,75 μm de diâmetro. Estes agrupam-se aos pares ou em cadeias, requerem meios nutricionalmente ricos para seu crescimento e temperatura média de 37°C. Em meio de cultura ágar Mitis salivarius acrescido de bacitracina (AMSB), formam colônias pequenas, com bordas irregulares, fortemente aderidas ao meio. Com adição de sacarose ao ágar, muitas linhagens de *S. mutans* produzem colônias com cerca de 1 mm de diâmetro (Figura 2).

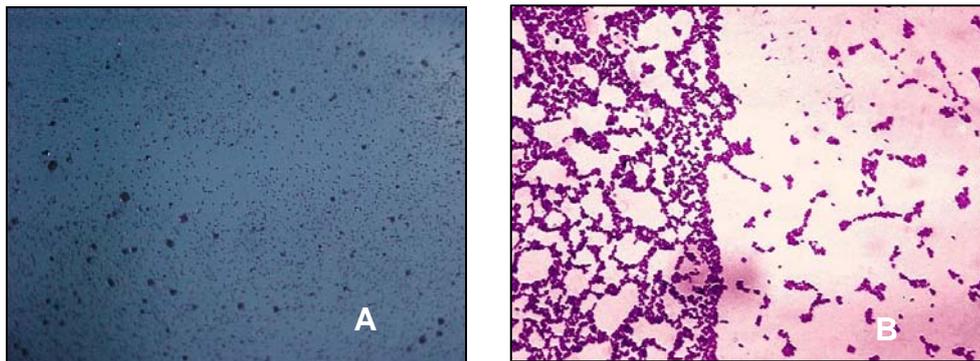


FIGURA 2 - MACRO E MICROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DE *Streptococcus mutans*

FONTE: O autor

Legenda: Características macro (A) das colônias em ágar mitis salivarius, com adição de sacarose e bacitracina. Micromorfologia (B) característica de *S. mutans*, coloração de Gram

O meio de cultura mais freqüente utilizado para o isolamento primário de *S. mutans* é o ágar mitis salivarius (AMS) com adição de sacarose, bacitracina e telurito de potássio (GOLD *et al.*, 1973). A identificação de *S. mutans* é baseada na macromorfologia em AMS, na micromorfologia, além de características de crescimento específicas quanto ao padrão enzimático e assimilação de açúcares (GRONROOS, ALALUSUA, 2000; KONEMAN *et al.*, 2001).

A partir das características bioquímicas e fisiológicas do *S. mutans* foi possível ressaltar e reconhecer a existência de biossorotipos variáveis, os quais foram reunidos em um grupo denominado “*mutans*”. Sendo assim, os estreptococos do grupo mutans foram originalmente descritos como uma única espécie *S. mutans*, dividida em oito subgrupos designados de *a* a *h*, em função da especificidade sorológica dos antígenos de carboidratos da parede celular. Mais tarde, esses vários sorotipos foram classificados em categorias de espécies independentes: *S. mutans* (que inclui os sorotipos: *c*, *e*, *f*) e *S. sobrinus* (sorotipos *d* e *g*), ambos predominantemente colonizadores da boca e tecido dentário de humanos (BENTLEY *et al.*, 1991) (Tabela 1).

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DIFERENCIAIS DAS ESPÉCIES DE ESTREPTOCOCOS DO “GRUPO MUTANS”, OS SOROTIPOS E A PRINCIPAL FONTE DE ISOLAMENTO

Características	Espécie de Streptococcus				
	<i>mutans</i>	<i>cricketus</i>	<i>sobrinus</i>	<i>rattus</i>	<i>macacae</i>
Fermentação de:					
- manitol	+	+	+	+	+
- sorbitol	+	+	d	+	-
- melibiose	+	d	d	+	+
- rafinose	+	+	d	+	-
Hidrólise de:					
- arginina	-	-	-	+	-
- esculina	+	d	d	+	-
Produção de H ₂ O ₂	-	-	+	-	-
Resistência à bacitracina -2UI/mL	+	-	+	+	-
Sorotipo	c, e, f	a	d, g	b	H
Fonte	homem	hamster Homem Ratos	homem	ratos	Macaco
% de isolamento no homem	90%	Raro	7-35%	Raro	0%

Legenda: (+) 90% das cepas ou mais positivas, (-) 90% das cepas ou mais negativas, (d) proporção substancial difere em Mayer (1989), com modificações

FONTE: (MOREIRA, 2006)

Assim, além do grupo mutans, que compreende os isolados de origem humana *S. mutans* e *S. sobrinus*, mais algumas espécies de origem animal como *S. cricketus*, *S. rattus* e *S. macacae*, os estreptococos viridans incluem outros grupos como: *salivarius* (*S. salivarius* e *S. vestibularis*), *mitis* (*S. mitis* e *S. oralis*) e *sanguis*

(*S. sanguis*, *S. godonni*, *S. parasanguis* e *S. crista*) (FRANDESEN, PEDRAZZOLI, KILIAN, 1991; KONEMAN, 2001).

Os *S. mutans*, *S. sobrinus* e outros membros de estreptococos bucais do grupo mutans são capazes de produzir enzimas denominadas glicosiltransferases, que hidrolisam a sacarose da dieta em glicose e frutose, e unem os resíduos de glicose entre si por meio de ligações glicosídicas α -1,6 e α -1,4, para formar glicanos insolúveis. Esses glicanos conferem aos microrganismos a capacidade de aderir às superfícies lisas dos dentes e formar a matriz do biofilme dental. A aderência específica de *S. mutans* e de outros microrganismos aos glicanos aderentes e insolúveis e a subsequente formação de ácidos, promovem a desmineralização do esmalte dentário e o início das lesões de cárie (LOECHE, 1986; GRÖNRROS, ALALUSUA, 2000).

Além disso, o *S. mutans* também parece produzir maior quantidade de ácidos a partir de carboidratos do que outras bactérias bucais, porque são capazes de fermentar grande variedade de açúcares e são mais resistentes aos ácidos que outros estreptococos bucais. Esses microrganismos também sintetizam polissacarídeos intracelulares que podem ser metabolizados para produzir ácidos na ausência de carboidratos fermentáveis exógenos (GRÖNRROS, ALALUSUA, 2000).

2.5.2 Fatores de Virulência

Gibbons (1984) relatou que o potencial de virulência de *S. mutans* é principalmente dependente das suas altas propriedades acidogênicas e da habilidade de se acumular nos dentes, especialmente devido à síntese de glicanos extracelulares a partir da sacarose.

A produção de ácidos e a capacidade de metabolização de substratos em meio ácido foram os primeiros fatores de virulência atribuídos a microrganismos específicos relacionados à etiologia da cárie (LOECHE, 1986; KÖHLER, BIRKHED, OLSSON, 1995).

Alguns estudos demonstraram que existem diferenças na capacidade de produção de ácidos entre as diferentes espécies de estreptococos do grupo mutans. De Soet *et al.* (1991), observaram que os *S. sobrinus* eram mais acidogênicos do que os *S. mutans* em animais gnobióticos. Köhler, Birkhed e Olsson (1995),

detectaram diferenças na produção de ácidos entre linhagens de *S. mutans* isoladas de humanos. Embora tenham observado grandes variações entre linhagens de *S. mutans* isolados de diferentes indivíduos, os autores não foram capazes de associar o potencial acidogênico com o número de lesões de cárie presentes nos indivíduos colonizados por estes microrganismos.

Entretanto, Köhler e Krasse (1990) observaram que linhagens de *S. mutans* isoladas de crianças livres de cárie, portadoras de altos níveis de estreptococos do grupo mutans, demonstraram baixa cariogenicidade em modelos animais, quando comparadas com outras linhagens da mesma espécie, isoladas de crianças altamente infectadas e com altos índices de cárie dental. Outros estudos demonstraram grande variabilidade na cariogenicidade de linhagens isoladas de humanos em modelos animais (DE SOET *et al.*, 1991), mas pouco se sabe sobre os fatores bacterianos relacionados a estas diferenças (BOWDEN, 1997).

A influência de fatores de virulência de *S. mutans* e de *S. sobrinus* na capacidade de colonização e indução da cárie dental poderia ser mais facilmente observada em populações mais homogêneas quanto às características sócio-econômicas, hábitos dietéticos, de higiene bucal e exposição ao flúor (MATTOS-GRANER, 1998).

Van Houte, Lopman e Kent (1996), avaliaram o pH final do meio de cultura rico em sacarose, após cultivo de amostra de biofilme dental em superfícies dentárias, com diferentes condições clínicas (lesões de cárie, lesões de manchas brancas em esmalte, lesões de cárie ativa e superfícies hígidas). Os autores observaram que, quando *S. mutans* estava presente em maior concentração no biofilme, foram detectados os menores valores de pH, em torno de 4,2, coincidindo com as amostras de biofilme nas superfícies dentárias com lesões, sugerindo que a cariogenicidade do biofilme dental é dependente do aumento na proporção de organismos acidogênicos e acidúricos.

Além da tolerância aos ácidos e produção de ácido, os *S. mutans* ainda possuem, como mecanismo de virulência, a capacidade de sobrevivência no biofilme dental devido à alta capacidade de adaptação ao ambiente, presença de adesinas na superfície celular, produção de glicosiltransferases, mutacina e polissacarídeos extracelulares (MATTOS-GRANER, 1999).

Em adição a esses fatores, outras propriedades podem influenciar a virulência de *S. mutans*, entre elas a atividade proteolítica capaz de degradar colágeno dos substratos (HOMER, WHILEY, BEIGHTON, 1990; JACKSON, LIM, DAO, 1997).

Enzimas associadas à célula do microrganismo utilizam sacarose como substrato, gerando glicose e frutose, e, por fermentação clássica produzem energia e grande quantidade de ácido láctico. Algumas moléculas de glicose provenientes da sacarose são convertidas em polissacarídeo intracelular de alto peso molecular (amilopectina ou glicogênio). Este processo proporciona armazenamento de material para o metabolismo energético quando nenhum substrato exógeno for encontrado. Além disso, os *S. mutans* podem produzir hidrolases glicosídicas que extraem hidratos de carbono da saliva para utilização como fonte de energia (GRÖNROOS, ALALUSUA, 2000).

Mattos-Graner *et al.* (2000), avaliaram algumas características fenotípicas de virulência de *S. mutans*, isolados de crianças com e sem atividade de cárie e observaram uma relação positiva entre a produção de glicanos insolúveis e a capacidade de adesão ao vidro. Isto sugere que as linhagens de crianças com alta atividade de cárie podem colonizar mais eficientemente, induzindo mais facilmente a cárie dental.

Avaliando a diversidade dos isolados de *S. mutans* em indivíduos livres de cárie e com presença de cárie ativa, Napimoga (2004) concluiu em seu estudo que indivíduos cárie ativos apresentavam um maior número de genótipos de *S. mutans* com alta capacidade de sintetizar glicanos insolúveis, quando comparados com genótipos isolados de indivíduos livres de cárie.

2.5.3 Colonização da Boca por *Streptococcus mutans*

Em geral, a aquisição de microrganismos pelo corpo humano ocorre por contato direto entre hospedeiro e outro, ou através de objetos inanimados, como chupetas e brinquedos. A saliva é a principal via de transmissão de *S. mutans* (KOHLEER e BRATTHALL, 1979), e a mãe é considerada a mais importante fonte de infecção para as crianças (LI e CAUFIELD, 1995; KLEIN *et al.*, 2004), embora outros estudos tenham sugerido haver outras formas de aquisição (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2006).

Após a colonização por esta bactéria, os níveis salivares de *S. mutans* tendem a se manter estáveis nos indivíduos analisados. Maltz e Zickert (1982) observaram que o uso de 1 a 3,2 g/dia de penicilina V oral por dez dias, diminui o número de *S. mutans* de $2,4 \times 10^6$ para $6,8 \times 10^3$ /mL de saliva. Entretanto, dois dias após a última administração do antibiótico, a contagem de *S. mutans* era quase a mesma que antes do tratamento, demonstrando que a colonização de *S. mutans* em humanos está diretamente relacionada aos fatores endógenos do hospedeiro.

Uma correlação significativa alta tem sido demonstrada entre o número de estreptococos do grupo mutans na saliva e sua prevalência na dentição, em termos de número de superfícies dentais colonizadas e nível de infecção das superfícies dentais (DUCHIN e VAN HOUTE, 1978; LINDQUIST, 1991).

Porém, os processos iniciais de colonização da boca incluem a introdução de diversas populações microbianas. Bactérias do gênero *Streptococcus* do grupo viridans (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. salivarius*) podem ser consideradas como pioneiras nesse processo, porém alguns organismos variam de acordo com as condições endógenas do hospedeiro (LI e CAUFIELD, 1995).

A colonização inicial por *S. mutans* na superfície bucal envolve interações entre a superfície da célula bacteriana e receptores da película adquirida, sendo este um mecanismo sacarose-dependente. Em seguida, com a entrada da sacarose, a célula bacteriana ativa as enzimas glicosiltransferases que sintetizam glicanos extracelulares, intensificando as ligações e o acúmulo de bactérias, resultando numa massa microbiana tenaz, o biofilme dental (CHIA *et al.*, 1998; BEIGTON, 2005).

Segundo Antony e Munshi (1997), *S. mutans* é acidúrico e tem requerimento nutricional simples, mas isto não pode ser o determinante primário para sua colonização. A produção de polissacarídeos a partir da sacarose pode facilitar a colonização de superfícies lisas dos dentes pelo *S. mutans*, porém a colonização parece ser uma consequência tardia da colonização inicial de fóssulas e fissuras. O *S. mutans* requer uma superfície não escovada ou limpa para sua colonização.

Ainda com relação aos fatores dietéticos, não há dúvidas que o principal componente da dieta, envolvido na etiologia da cárie dental, é a sacarose (LOECHE, 1986; TANZER, 1992). Estudos *in vitro* demonstram que a presença freqüente de sacarose propicia quedas constantes do pH, favorecendo microrganismos acidúricos

como estreptococos do grupo mutans e lactobacilos (BRADSHAW e MARSH, 1998). Mais relevante é o fato de que a sacarose é o único substrato a partir do qual são produzidos polissacarídeos extra-celulares (PEC) por estreptococos do grupo mutans, sendo que os PEC insolúveis em água (glicanos) são importantes para a colonização e acúmulos destas bactérias nas superfícies dentárias (TANZER, 1992; HAJISHENGALLIS e MICHALEK, 1999).

Os mecanismos precisos pelos quais os *S. mutans* são capazes de colonizar e se acumular nas superfícies dentárias ainda vêm sendo esclarecidos. Duas fases distintas, aparentemente independentes, parecem caracterizar a colonização dos dentes. A fase primária ou inicial de colonização é dependente da interação específica de proteínas da película adquirida do esmalte com moléculas de superfície da célula bacteriana, denominadas adesinas. A segunda fase de colonização é denominada fase de acúmulo e propicia o aumento do número de células bacterianas no biofilme dental, sendo importante para a produção de ácidos, o que favorece os processos de desmineralização dental. O acúmulo de *S. mutans* nas superfícies dentárias envolve diferentes processos de interação, coaderência e coagregação com outros microrganismos bucais (KOLENBRANDER e LONDON, 1993).

Caulfield, Cutter e Dasanayake (1993), em estudo longitudinal de 46 crianças, desde o nascimento até cinco anos de idade, detectaram *S. mutans* em 21% das crianças aos 19 meses de idade e em 62% das crianças aos 31 meses de idade. Aquelas não infectadas até os 31 meses de idade, mantiveram-se livres de *S. mutans* até os cinco anos de idade. Estes autores sugerem que o período crítico para implantação de *S. mutans* na boca corresponderia ao intervalo entre 19 e 31 meses de idade, o qual foi denominado de “janela de infectividade”, que coincide com a erupção dos molares decíduos.

Segundo Alaluusua *et al.* (1996), a maior diversidade genética de estreptococos do grupo mutans observada em crianças com cárie de mamadeira, deve-se às condições propícias do ambiente para o estabelecimento de múltiplos genótipos. Entretanto, contrário a esta posição, Kreulen *et al.* (1997), verificaram que crianças com lesões de “cárie rampante” apresentavam apenas uma linhagem de *S. mutans*, enquanto os respectivos irmãos, sem lesões de cárie, apresentavam de duas a cinco linhagens, sugerindo que clones específicos de *S. mutans* são selecionados em cavidades orais com atividade de cárie.

A infecção por *S. mutans* demonstra-se capaz de predizer cárie dental em idade precoce, independente da presença inicial de lesões de cárie (O'SULLIVAN e THIBODEAU, 1996). Alaluusua e Renkonen (1983) verificaram que crianças finlandesas com níveis detectáveis de *S. mutans* aos dois anos de idade, apresentaram uma incidência de cárie dental cerca de 11 vezes maior do que crianças não colonizadas por estes microrganismos, após dois anos de acompanhamento. Embora um grande número de trabalhos demonstre uma associação significativa entre a infecção precoce de *S. mutans* e a incidência de cárie dental (ALALUUSUA e RENKONEN, 1983; FUJIWARA *et al.*, 1991; GRINDEFJORD *et al.*, 1996), a simples detecção destes microrganismos na saliva ou biofilme dental não justifica o desenvolvimento de cárie dental (BEIGTON, 2005).

2.5.3.1 Produção de polissacarídeos extracelulares por *S. mutans*

Estreptococos do grupo mutans são capazes de sintetizar PECs de alto peso molecular formados por cadeias altamente ramificadas, que compõem uma matriz extracelular com propriedades físico-químicas particulares (TANZER, 1992). Estes polissacarídeos são sintetizados apenas a partir da sacarose, um dissacarídeo formado pela ligação de uma molécula de glicose com frutose, através de uma ponte glicosídica (GARRET e GRISHAM, 1995). *S. mutans* são capazes de sintetizar polissacarídeos de glicose, denominados glucanos, e polissacarídeos de frutose, denominados frutanos. *S. sobrinus*, por outro lado, sintetizam apenas os glucanos (TANZER, 1992; FUJIWARA, 2002). Os glucanos solúveis em água apresentam uma predominância de ligações do tipo α -1-6 entre as moléculas de glicose, são importantes fontes de substrato disponível em condições de limitação de nutrientes e atuam como iniciadores da produção de glucanos insolúveis em água (GI). Os glucanos insolúveis em água são ricos em ligações do tipo α -1-3, sendo também referidos como glucanos álcali-solúveis, uma vez que são solubilizados em soluções alcalinas de NaOH (SMITH e TAUBMAN, 1987).

Os glucanos são sintetizados por enzimas extracelulares denominadas glicosiltransferases (GTF), as quais hidrolisam as moléculas de sacarose e polimerizam as moléculas de glicose liberadas. Estas enzimas podem estar ligadas à superfície das células de *S. mutans* ou livres no meio extracelular (HAJISHENGALLIS e MICHALEK, 1999).

Fujiwara (2002) menciona três tipos diferentes de GTFs secretadas por *S. mutans*: GTF-B, GTF-C e GTF-D. A GTF-B é codificada pelo gene *gtfB* e está envolvida na síntese de glucanos insolúveis em água (GI) (SHIROZA *et al.*, 1987), enquanto a GTF-C (expressa a partir do gene *gtfC*) catalisa a reação de produção de glucanos solúveis e insolúveis em água (HANADA e KURAMITSU, 1988). A GTF-D sintetiza apenas glucanos solúveis em água, sendo codificada pelo gene *gtfD* (HONDA *et al.*, 1990). *S. sobrinus* expressam quatro enzimas GTF distintas, sendo que apenas uma delas sintetiza exclusivamente glucanos insolúveis (GTF-I) (ABO *et al.*, 1991; HANADA *et al.*, 1991).

A Tabela 2 mostra as GTFs expressas pela linhagem GS-5 de *S. mutans*.

TABELA 2 - ENZIMAS GLICOSILTRANSFERASES (GTF) EXPRESSAS POR *Streptococcus mutans*

Espécie	Linhagem	Enzima	Massa Molecular (kDa)	Gene	Glucano	Referência
<i>S. mutans</i>	GS-5	GTF-B	165,8	<i>gtfB</i>	ligações α -1-3	Shiroza <i>et al.</i> , 1987
		GTF-C	153,0	<i>gtfC</i>	ligações α -1-3 e α -1-6	Hanada e Kuramitsu, 1988
		GTF-D	159,0	<i>gtfD</i>	ligações α -1-6	Honda <i>et al.</i> , 1990

ND = não descrito

As GTFs são proteínas de alto peso molecular (140-160 kDa) formadas por uma seqüência de aproximadamente 1.500 aminoácidos. Em geral, as GTFs apresentam como características comuns um peptídeo sinal de cerca de trinta resíduos de aminoácidos na sua porção amino-terminal (NH₂), característico de diferentes proteínas secretadas, seguido de uma cadeia de aproximadamente 1.000 resíduos de aminoácidos, formada por partes muito conservadas intercaladas com áreas mais variáveis, a qual contém o domínio catalítico (SMITH e TAUBMAN, 1987; HAJISHENGALLIS e MICHALEK, 1999). Através de mutagênese sítio-dirigida, identificou-se um resíduo de ácido aspártico (Asp⁴¹³) essencial para a atividade enzimática da GTF-B (TSUMORI e KURAMITSU, 1997). As seqüências de aminoácidos próximas deste resíduo de aspartato demonstram-se bem conservadas em todas as GTFs das espécies de *S. mutans* (SMITH *et al.*, 1997). No extremo carboxi-terminal, as GTFs apresentam repetições de aminoácidos, que parecem ser

fundamentais para a ligação das GTFs aos glucanos (KATO e KURAMITSU, 1990; ABO *et al.*, 1991). A habilidade das GTFs em se ligar aos glucanos produzidos é, também, pré-requisito para sua atividade enzimática (SHIROZA UEDA, KURAMITSU, 1987).

A Figura 3 mostra a estrutura primária das GTFs expressadas por *S. mutans*.

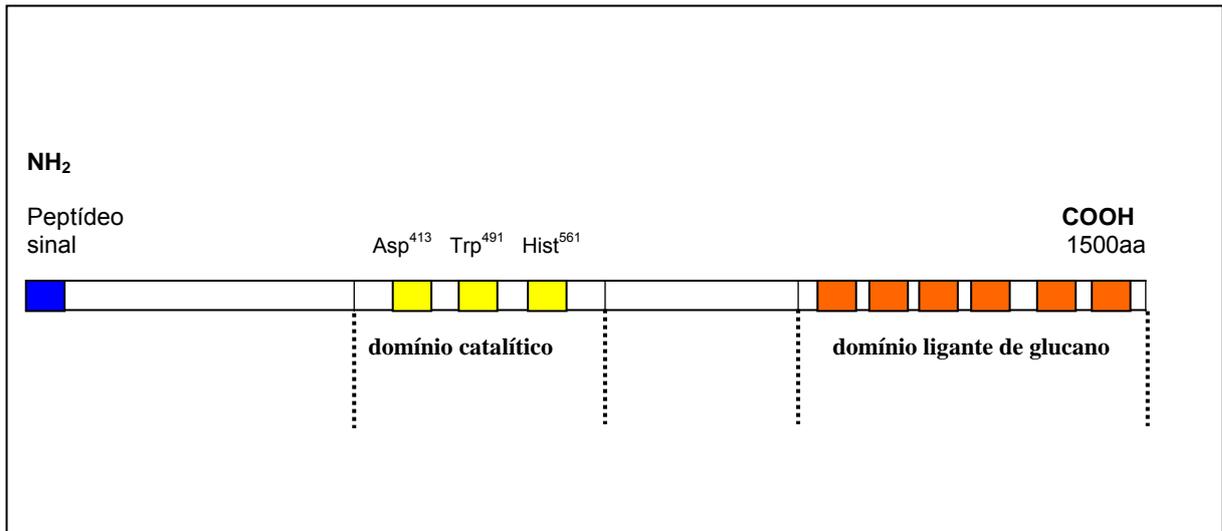


FIGURA 3 - ESTRUTURA PRIMÁRIA DAS ENZIMAS GTFs EXPRESSAS POR *S. mutans*

Legenda: Extremidade amido (NH₂) terminal, observa-se um peptídeo sinal em azul, seguido pelo domínio catalítico (em amarelo). Repetições peptídicas (em laranja), na porção carboxi-terminal estão associadas com a capacidade de ligação das GTFs aos glucanos (KATO e KURAMITSU, 1990; ABO *et al.*, 1991), sendo também necessárias à atividade enzimática (SHIROZA *et al.*, 1987)

FONTE: MATTOS- GRANER, 1999

Os glucanos insolúveis e as enzimas GTF participam da ligação e acúmulo de células de *S. mutans*, em conjunto com outras proteínas secretadas por estes microrganismos, as proteínas ligantes de glucano (PLGs) (SMITH *et al.*, 1994). Assim como as GTFs, as PLGs encontram-se associadas à superfície celular ou no meio extracelular e promovem a interação da superfície da célula com os glucanos insolúveis em água (RUSSELL, 1979; SMITH *et al.*, 1994). Há indícios de que as proteínas ligantes de glucanos modificam a estrutura do biofilme dental tornando-a mais cariogênica (HAZLETT, MICHALEK, BANAS, 1998; HAZLETT, MAZURKIEWICZ, 1999).

Estudos *in vitro* demonstram que as linhagens de *S. mutans* mutantes, que

não expressam GTF-B e GTF-C, apresentam uma aderência sacarose-dependente *in vitro* de apenas 0,5%, enquanto que linhagens selvagens demonstram uma aderência de 77,9% (TSUMORI e KURAMITSU, 1997). Linhagens de *S. mutans* transformadas geneticamente para não expressarem GTF-B e GTF-C, induzem lesões de cárie em superfícies lisas e oclusais em número significativamente inferior do que linhagens selvagens (MUNRO, MICHALEK, MACRINA, 1991).

Yamashita *et al.* (1993) avaliaram a cariogenicidade de linhagens de *S. mutans* que não expressavam cada um dos genes *gtf*, em ratos alimentados com dieta contendo 56% de sacarose. As linhagens que não expressaram GTF-B, produziram apenas 69% da quantidade de GI e induziram um número de dois a cinco vezes menor de lesões de cárie em superfícies dentárias lisas, quando comparadas com as linhagens selvagens. As linhagens mutantes que não expressaram GTF-C, produziram 84% do GI e uma incidência de lesões de cárie em superfícies lisas de cerca de um e meio a quatro vezes menor do que os isolados selvagens. Linhagens defectivas em ambas as enzimas, GTF-B e GTF-C, praticamente não sintetizaram GI e demonstraram uma incidência de cárie de duas a cinco vezes menor. Tsumori e Kuramitsu (1997), demonstraram que linhagens *in vitro* defectivas de um ou mais genes *gtf*, têm sua capacidade de aderência reduzida.

Em 1995, Vickerman e Jones purificaram as enzimas GTFB, GTFC e GTFD e caracterizaram a atividade dessas enzimas em solução e aderidas à superfície, explorando o papel de seus produtos, os glucanos, na aderência bacteriana em uma película experimental. Os autores demonstraram que as enzimas GTFB, GTFC e GTFD são ativas na película experimental e que o comportamento dessas enzimas em solução pode diferir daquele da enzima aderida à superfície aderida de hidroxiapatita. Em acréscimo, os glucanos produzidos pela GTFB ou GTFC, mas não pela GTFD, aumentaram a aderência de *S. mutans* GS5 e *S. sobrinus* 6715 à película.

Mattos-Graner *et al.* (2000), avaliaram algumas características fenotípicas de virulência de *S. mutans* isolados de crianças com e sem cárie, e observaram uma relação positiva entre a produção de glucanos insolúveis e a capacidade de adesão ao vidro, sugerindo que isolados de crianças com alta atividade de cárie podem colonizar melhor, induzindo à cárie dental.

Anticorpos salivares contra GTFs reduzem significativamente a capacidade de colonização dos dentes por *S. mutans* em animais (SMITH, TAUBMAN e EBERSOLE, 1992). A indução do sistema imune de mucosas contra peptídeos correspondentes ao sítio catalítico da GTF (altamente homólogos entre diferentes tipo de GTF) é capaz de reduzir significativamente o desenvolvimento da cárie dental em ratos alimentados com dieta contendo 56% de sacarose (SMITH, TAUBMAN, EBERSOLE, 1992; SMITH *et al.*, 1994; TAUBMAN, HOLMBERG, SMITH, 1995; SMITH *et al.*, 1997). Em humanos com 18 a 36 anos de idade, a imunização via oral contra GTF e *S. sobrinus* foi capaz de induzir a produção de IgA salivar e IgG no soro (SMITH e TAUBMAN, 1987). Após 42 dias decorrentes da primeira imunização, observou-se uma redução nos níveis salivares de *S. mutans* em comparação aos níveis destes microrganismos detectados no início do estudo, embora os resultados tenham variado entre indivíduos (SMITH e TAUBMAN, 1987).

Embora o papel da expressão e atividade das GTFs tenham sido muito bem estudados através de experimentos *in vitro* e em modelos animais, não há evidências da influência da intensidade de expressão e atividade destas enzimas na virulência de linhagens isoladas de humanos. A maior parte dos estudos realizados nesta área utilizam clones geneticamente conhecidos de *S. mutans* e *S. sobrinus* (SMITH *et al.*, 1993, TAUBMAN, HOLMBERG, SMITH, 1995; TSUMORI e KURAMITSU, 1997) e pouco se sabe sobre as características específicas das GTFs expressas por isolados de humanos (FUJIWARA *et al.*, 1998). Alaluusua *et al.* (1997) avaliaram a expressão de GTF em isolados de 12 crianças finlandesas de um ano e meio a três anos de idade, sendo que, destas, seis tinham cárie de mamadeira e seis eram livres de cárie. Estes autores não detectaram diferenças na expressão das enzimas GTF-B, GTF-C e GTF-D entre os grupos. Chia *et al.* (1991) demonstraram polimorfismo dos genes *gtfB* em 33 isolados de *S. mutans* em humanos na Tailândia, sugerindo que este polimorfismo pode estar associado a variações na atividade enzimática. Através da análise de restrição dos genes *gtf* expressos pela linhagem *S. mutans* UA101, também isolada de humanos, Yamashita, Bowen e Kuramitsu (1992) sugeriram que as mesmas apresentavam um único gene codificador de enzimas GTFs capazes de sintetizar GI, resultante da combinação homóloga entre os genes *gtfB* e *gtfC*. Esta linhagem, *S. mutans* UA101, demonstrou uma baixa produção de GI por GTFs purificadas de sobrenadantes das

culturas celulares e uma baixa aderência dependente de sacarose *in vitro*, quando comparadas com a linhagem *S. mutans* GS-5 (YAMASHITA, BOWEN e KURAMITSU, 1992). Fujiwara *et al.* (1998) clonaram e sequenciaram os genes *gtfB*, *gtfC* e *gtfD* de cinco linhagens de *S. mutans* isoladas de humanos no Japão e verificaram que, exceto para os genes *gtfC*, as seqüências nucleotídicas dos genes *gtf* foram praticamente idênticas entre as linhagens estudadas e aos genes *gtfs* expressos pela linhagem GS-5. Mais estudos são necessários para avaliar a relação entre variações nos genes *gtf* e a capacidade de síntese de GI e habilidade de colonização e acúmulo nas superfícies dentárias, bem como sua influência na cariogenicidade de clones específicos.

2.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *S. mutans*

O conhecimento da seqüência completa do genoma do *S. mutans*, possibilitou um melhor entendimento da complexidade e especificidade genética deste organismo. Este agente difere de outros patógenos humanos do gênero como *S. pyogenes* e *S. pneumoniae*, que, embora façam parte da flora bucal humana, são apenas incidentalmente patógenos bucais (ADJIC *et al.*, 1999).

De acordo com a análise do seu genoma o *S. mutans* é capaz de metabolizar a mais vasta variedade de carboidratos do que qualquer outro organismo Gram-positivo seqüenciado até hoje, podendo sintetizar todos os seus aminoácidos necessários. O número de proteases, peptidases e outras exoenzimas produzidas por *S. mutans* claramente sugerem que este obtém recursos dos tecidos de seu hospedeiro. A análise da seqüência genômica mostrou que aproximadamente 16% de suas ORFs (*Open Reading Frames*) correspondem a genes únicos e revelou a prevalência de muitos genes, não caracterizados previamente, como envolvidos na virulência, transporte e regulação gênica. Estas descobertas provêm base para o desenvolvimento futuro de drogas e novas abordagens na prevenção e tratamento da cárie dental (ADJIC *et al.*, 1999).

Outros métodos de identificação molecular do *S. mutans* também podem ser utilizados como anticorpos monoclonais, análise de DNA através de detecção de genes específicos, como o gene B-glicosiltransferase (*gtf-B*), gene frutossiltransferase (*fff*) e gene dextranase (*dexA*) (CHIA *et al.*, 1991).

2.6.1 Diversidade das Espécies de Estreptococos do Grupo Mutans

A diversidade das espécies bacterianas é evidente, considerando-se as próprias variações fenotípicas observadas através de estudos de sorotipagem, tipagem de bacteriocinas e biotipagem (BOWDEN, 1997). Uma vez que as bactérias se propagam através da divisão binária, cada geração é geneticamente igual à próxima célula que será gerada. No entanto, podem ocorrer mutações casuais gerando um clone específico. Além disso, por meio de recombinação genética pode ocorrer alterações mais extensas, como a incorporação de um plasmídeo (DNA circular) ou transposon no genoma de uma célula hospedeira (CAUFIELD, 1997).

A comparação entre clones de *S. mutans* isolados de diferentes indivíduos permitiu a identificação das mães como a fonte principal de infecção de seus filhos (MOREIRA, 2006). A análise dos padrões de restrição de DNA de isolados de *S. mutans*, em indivíduos adultos e crianças, não demonstrou o mesmo padrão entre duas pessoas, a não ser entre aquelas relacionadas de alguma forma, como entre mãe e filho e entre irmãos (LI e CAUFIELD, 1995). Existem evidências de que clones de *S. mutans*, assim como de microrganismos periodontopatogênicos, como *Porphyromonas gingivalis* e *Actinobacillus actinomycescomitans*, possam ser transmitidos entre cônjuges em convivência prolongada, visto que estes indivíduos compartilham de pelo menos um ribotipo destas bactérias (SAARELA *et al.*, 1993).

Clones bacterianos selecionados podem estar associados com a maior virulência, como demonstrado, por exemplo, em *Haemophilus influenzae* (MUSSER *et al.*, 1988) e *Actinobacillus actinomycescomitans* (MAYER *et al.*, 1999). Pouca informação existe ainda sobre o impacto da diversidade de clones de *S. mutans* e *S. sobrinus* na transmissão e severidade da cárie dental (BOWDEN, 1997), sendo este um campo promissor para o melhor entendimento dos processos de colonização e indução de cárie dental por estes microrganismos. Grandes variações na cariogenicidade de linhagens de *S. mutans* e *S. sobrinus* isolados de humanos foram observadas em modelos animais (KÖHLER e KRASSE, 1990; DE SOET *et al.*, 1991).

Alaluusua *et al.* (1996) avaliaram a diversidade genética de *S. mutans* em seis crianças livres de cárie e seis crianças com cárie de mamadeira na faixa etária de três a cinco anos, através da análise do padrão de restrição do DNA ribossômico (ribotipagem). Estes autores estudaram de três a treze isolados de *S. mutans* e

identificaram mais de um ribotipo de *S. mutans* entre as quatro crianças que apresentavam cárie rampante. Apenas uma das crianças livres de cárie apresentou mais de um ribotipo, sugerindo que indivíduos com maior atividade de cárie apresentam maior diversidade de clones de *S. mutans*. Por outro lado, Kreulen *et al.* (1997) sugerem que clones específicos de *S. mutans* são selecionados em crianças com alta atividade de cárie. Estes autores avaliaram a diversidade de clones de *S. mutans* isolados em amostras de biofilme dental associadas ou não a lesões de cárie e em amostras de saliva, coletadas de sete pares de irmãos e respectivas mães, sendo que, em um dos irmãos avaliaram trinta ou mais isolados por indivíduo, cujo padrão genético foi por RAPD. As sete crianças com cárie rampante apresentavam apenas um clone de *S. mutans*, enquanto os irmãos com baixa atividade de cárie apresentavam de dois a cinco clones distintos.

2.6.1.1 Avaliação da variabilidade genética do Grupo Mutans por meio de marcadores moleculares

O uso de técnicas moleculares é uma abordagem nova e eficaz para a identificação das espécies bacterianas que compõem as comunidades microbianas residentes nos diversos órgãos do corpo e de bactérias associadas a processos patológicos.

Com a diversidade de bactérias associadas à doença cárie, é possível que diferentes genótipos de *S. mutans* possam exercer efeito seletivo na manifestação clínica da doença. O conceito de diversidade, aqui abordado, compreende a diversidade apresentada abaixo do nível de espécie, também chamada de diversidade intra-específica (SCHLOTTER *et al.*, 2000), pela qual são avaliadas estirpes pertencentes a mesma espécie. Para o estudo da diversidade intra-específica, geralmente são utilizadas técnicas de impressão digital com alta resolução. Isso se deve, em parte, à impossibilidade do uso de métodos tradicionais da Microbiologia e à dificuldade de se construir *oligonucleotídeo iniciadors* e sondas estirpe-específicas, em razão da pequena variabilidade entre as seqüências de nucleotídeos (LUDWING e SCHLEIFER, 1994). Vários fatores podem influenciar a diversidade intraespecífica, entre eles, a separação espacial, diferenças ambientais e interações bactéria-hospedeiro (SCHLOTTER *et al.*, 2000).

A variabilidade genética de microrganismos pode ser detectada por análise do fenótipo ou por marcadores moleculares. A primeira, considerada clássica, baseia-se na caracterização morfológica ou bioquímica, restringindo os estudos em populações. As técnicas moleculares, por sua vez, fornecem ferramentas para evidenciar, e entender melhor, diversos aspectos relacionados diretamente ou indiretamente ao DNA. Desta forma, a análise dos ácidos nucléicos vem sendo amplamente utilizada na diferenciação de indivíduos e no esclarecimento filogenético dos organismos estudados (FERREIRA, 2000).

Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para a detecção da variabilidade genética, ou seja, de polimorfismo genético, como, por exemplo, análise de plasmídeos, análise com enzimas de restrição, RAPD e ribotipagem. Em Microbiologia Bucal, a análise de DNA baseada em traços do genótipo oferece uma rápida e realista identificação das bactérias, comparada com métodos baseados em caracterização do fenótipo.

Os marcadores moleculares, baseados em PCR, podem ser utilizados no estudo de evolução molecular, na detecção de infecções microbianas através da amplificação do DNA do patógeno com oligonucleotídeos iniciadores específicos ao seu genoma e na medicina forense (WATSON *et al.*, 1992; ALBERTS *et al.*, 2004).

A PCR é hoje uma tecnologia com inúmeras aplicações em Ciências Biológicas, tanto em pesquisa básica como aplicada, tendo proporcionado o seu autor, Kary B. Mullis, no início da década de 90, o prêmio Nobel de Medicina. Por meio da PCR, pode-se, a partir de uma única molécula de DNA, gerar 100 bilhões de moléculas similares em algumas horas (MULLIS, 1990).

A PCR pode ser definida como um método “*in vitro*” para produzir grandes quantidades de um fragmento específico de DNA, de tamanho e seqüência definidos, a partir de uma pequena quantidade de um molde complexo de ácido nucléico (MULLIS e FALOONA, 1987; SAIKI *et al.*, 1988). A reação de amplificação é catalizada pela DNA polimerase, que alonga um pequeno fragmento de DNA de fita simples, chamado de oligonucleotídeo iniciador ou *primer*, quando este está ligado a uma fita molde de DNA. O alongamento é feito pela adição, na extremidade 3’OH do iniciador, do nucleotídeo complementar ao nucleotídeo correspondente na fita molde. O fragmento amplificado é aquele compreendido entre as duas

extremidades 3' de um segmento "duplex", complementares aos dois iniciadores utilizados na reação. Os iniciadores são sintetizados artificialmente, tendo como base uma seqüência de nucleotídeos complementares as seqüências que delimitam o fragmento de ácido nucléico a ser amplificado.

A PCR tem a vantagem de necessitar somente de quantidades muito pequenas do DNA a ser amplificado. É uma técnica tão sensível, que o DNA isolado de uma única célula, é suficiente para detecção de seqüências específicas de genes. Além da detecção de genes em um DNA genômico, a PCR pode ser aplicada para clonagem de DNA; sequenciamento; quantificação de seqüências específicas; análise de expressão gênica pela amplificação a partir de mRNA; mutagênese direta e indireta; análise da estrutura de genomas; análise de interações DNA-proteína; evolução molecular; identificação de mutações, novos membros de famílias multigênicas e de polimorfismo; diagnóstico de patógenos e de doenças hereditárias; identificação de anormalidades cromossomais; mutações somáticas específicas e terapia gênica (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998).

O resultado da amplificação de ácidos nucléicos por PCR pode ser facilmente visualizado por eletroforese em gel de agarose. O sucesso da amplificação depende das condições da reação, da pureza dos reagentes utilizados e dos diferentes parâmetros da reação (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998).

A necessidade do conhecimento prévio da seqüência que flanqueia o segmento a ser amplificado para que os oligonucleotídeos possam ser construídos, é uma das limitações da técnica de PCR (WATSON *et al.*, 1992; ALBERTS *et al.*, 2004). Para solucionar este problema Willians *et al.* (1990), Welsh e McClelland (1990) desenvolveram-se uma técnica denominada RAPD (*Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso*). Esta técnica baseia-se na amplificação de segmentos de DNA por um único oligonucleotídeo de seqüência arbitrária (WILLIAMS *et al.*, 1990).

As tecnologias de marcadores moleculares estão evoluindo rapidamente e modificações já existem para algumas das técnicas acima descritas. Contudo, os tipos de marcadores aqui abordados são ainda os mais utilizados em estudos genéticos e programas de melhoramento. Atributos como consistência e tempo de obtenção de resultados, nível de polimorfismo obtido, custo e facilidade de uso são importantes para a implementação de marcadores moleculares.

O RAPD é baseado na amplificação de segmentos de DNA, utilizando o mesmo princípio da PCR (SAIKI *et al.*, 1985). A principal diferença entre a PCR usual e o RAPD está na reação de amplificação que utiliza apenas um único oligonucleotídeo, com uma seqüência arbitrária de 10 a 15 bases. A amplificação somente ocorre se este *oligonucleotídeo iniciador* arbitrário for complementar a um sítio em uma das fitas, e complementar a um mesmo sítio (com orientação invertida) na outra fita de DNA. Os fragmentos amplificados apresentam de 4 a 10 kb, dependendo do limite máximo de amplificação da DNA polimerase empregada (WILLIAMS *et al.*, 1990).

A técnica RAPD permite caracterizar e avaliar o grau de similaridade genética entre genótipos aos níveis inter e intraespecíficos, sendo altamente sensível a diferenças de até um único nucleotídeo entre o *oligonucleotídeo iniciador* e o DNA molde. Permite ainda a obtenção de *fingerprints* genômicos de indivíduos, variedades e populações; análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma; construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica, localização de genes de interesse econômico, e ainda, a obtenção de novos marcadores para diagnósticos via PCR (FUNGARO e VIEIRA, 1998; FUNGARO, 2000).

Marcadores RAPD também oferecem a possibilidade de amostrar regiões do DNA repetitivo, uma vez que os *oligonucleotídeo iniciadores* utilizados para detecção da variação são arbitrários, ao contrário das sondas RFLP que são pré-selecionadas para regiões de cópia única (WILLIAMS *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 1993). O RAPD reúne, assim, a simplicidade da técnica da visualização direta dos marcadores isoenzimáticos com o poder de resolução dos marcadores de DNA. O uso desta técnica não requer experiência profunda em biologia molecular e nem instalações sofisticadas de laboratório. Neste contexto, a técnica RAPD é um das poucas ferramentas disponíveis que, efetivamente, permitem a análise genética detalhada com um grande número de marcadores (MEGNEGNEAU; DEBETS; HOCKSTRA, 1993).

Klein *et al.* (2004) caracterizaram por RAPD isolados de *S. mutans* e *S. sobrinus*, com o objetivo de monitorar e acompanhar a colonização da boca de 16 crianças e suas mães, durante 20 meses. Foram analisados o padrão de transmissão vertical de mãe para filho, a diversidade genotípica e a persistência das linhagens. Observou-se

um aumento da diversidade genotípica de *S. mutans* na boca durante o período de acompanhamento. Alguns genótipos foram adquiridos, alguns persistiram e outros foram perdidos, refletindo o desenvolvimento contínuo da microbiota bucal da criança.

Saarela *et al.* (1996) propuseram o emprego do RAPD na genotipagem de diferentes espécies e sorotipos de estreptococos bucais. Os autores observaram que os resultados se repetiam quando os mesmos isolados eram submetidos à ribotipagem, e que o poder discriminatório dessas duas técnicas era superior à simples sorotipagem, gerando maior número de biótipos.

A aplicação do RAPD em estudos de clonalidade individual ou familiar envolvendo estreptococos bucais foi proposta por LI e CAUFIED (1998), que após uma discriminação com vários *oligonucleotídeo iniciadors*, mostraram que esse recurso pode ser de grande valia em levantamentos onde são obtidos mais de um clone bacteriano por indivíduo.

Gronroos e Alaluusua (2000), utilizando a técnica de RAPD, identificaram de um a quatro diferentes clones de *S. mutans* em crianças de três a sete anos, além de constatarem que os diferentes clones foram encontrados em diferentes sítios, sugerindo que os mesmos colonizam sítios específicos.

Redmo-Emanuelsson *et al.* (2003), investigaram a presença de diferentes genótipos e a estabilidade de *S. mutans* em diferentes sítios da boca de um mesmo indivíduo, utilizando a técnica de RAPD. Foram encontrados até sete diferentes clones, considerando-se toda a boca. Os autores encontraram até quatro diferentes clones em um mesmo sítio, e estes mesmos genótipos foram encontrados em uma segunda avaliação realizada entre quatro a sete meses após a coleta inicial, indicando genótipos estáveis.

Napimoga *et al.* (2005), em recente estudo usando a técnica de RAPD, encontrou o máximo de oito genótipos de *S. mutans* em indivíduos jovens, que apresentavam cárie ativa.

Os ácidos ribonucléicos ribossomais (RNAr) são considerados os biopolímeros mais adequados para estudo da diversidade. Seus genes são universalmente distribuídos e apresentam elevado grau de conservação. Sua variabilidade pode apresentar-se em maior ou menor extensão, em diferentes regiões da molécula (LANE *et al.*, 1985).

A combinação das tecnologias de PCR e de seqüenciamento de ácidos nucléicos permite a identificação de uma ampla gama de bactérias, incluindo aquelas para as quais os métodos convencionais de isolamento e cultivo em meios de laboratório ou culturas de células ainda não foram desenvolvidos.

A utilização do sequenciamento de regiões intergênicas 16S-23S baseia-se na existência de seqüências altamente conservadas nos genes DNAr da subunidade menor dos ribossomos (RNAr 16S) de todas as bactérias e seqüências intersticiais variáveis nessas moléculas, que são espécie-específicas. A molécula de RNAr 16S é encontrada em todas as bactérias e tornou-se padrão universal para a sua identificação e classificação. A amplificação, por PCR, de seqüências de DNA complementares às seqüências variáveis do DNAr 16S de um microrganismo desconhecido e sua comparação com seqüências variáveis do RNAr 16S de espécies conhecidas, fornece informação suficiente ou para identificá-lo como membro de uma espécie ou grupo conhecido ou colocá-lo em uma nova espécie (REIS *et al.*, 2006).

Laguerre *et al.* (1996) caracterizaram 43 estirpes de *Rhizobium leguminisarum* de diferentes biovares, por meio da análise de restrição da região intergênica 16S-23S DNAr. Os padrões de restrição permitiram a diferenciação das estirpes ao nível intraespecífico. Os autores afirmam que, por meio dos padrões de bandejamento facilmente analisáveis e reproduzíveis, gerados pela restrição da região intergênica, foi possível discriminar as estirpes até o limite determinado pela elevada similaridade existente.

Azevedo *et al.* (1998) analisou os perfis de restrição da região intergênica 16S-23S DNAr de 71 estirpes de *A. amazonense*. Seus resultados mostram, ao nível intra-específico, a existência de grande diversidade genética entre as estirpes.

A adaptação a um ambiente altamente competitivo por meio de transformações genéticas não ocorre frequentemente, porém quando esta ocorre, pode ser altamente vantajosa para o microrganismo, podendo este adquirir um gene de resistência a antibiótico ou um fator de virulência, promovendo grande vantagem seletiva (LI, CAUFIELD e EMANUELSSON, 2001). Paddick *et al.* (2003) avaliaram o efeito do ambiente na diversidade genotípica de *A. naeslundii* e *S. oralis* no biofilme dental proveniente de indivíduos livres de cárie e cáries ativos. Os autores

encontraram um número de genótipos de *A. naeslindi* muito próximo em ambos os grupos, porém, o número de genótipos de *S. oralis* isolados do biofilme proveniente de indivíduos cáries-ativos foi superior e estatisticamente significativo, quando comparado com o grupo de indivíduos livres de cárie. Os autores sugerem que, devido ao constante estresse ambiental, como por exemplo, a queda de pH, a diversidade ecológica do biofilme dental pode ser alterada, em relação a algumas espécies bacterianas.

A existência de polimorfismo nos genes *gtfs* expressos por diferentes linhagens de *S. mutans* (CHIA *et al.*, 1991; YAMASHITA *et al.*, 1992) poderia estar associada às variações na atividade enzimática específica (Chia *et al.*, 1991). Alterações de um único aminoácido dentro do domínio catalítico das GTFS provocadas por mutagênese sítio-dirigida são capazes de alterar sensivelmente a atividade enzimática (CHIA *et al.*, 1998)

2.6.2 Análise de Distância

Emile Zuckerkandl e Linus Pauling (1965) introduziram a idéia de que moléculas podem ser usadas como “cronômetros moleculares”, abrindo a possibilidade do uso de moléculas de DNA ou proteínas como “documentos da história evolutiva” de seres vivos. Uma década mais tarde, Carl Woese e colaboradores identificaram o gene do RNA ribossomal 16S como poderoso marcador filogenético, utilizando-o para propor um terceiro domínio dos seres vivos, o domínio das Arqueobactérias (FOX *et al.*, 1980). O conteúdo informativo das moléculas marcadoras é crítico na análise filogenética e o esforço para reconstruir a história de um gene ou organismo analisando seqüências moleculares particulares está em função do número e caráter das mudanças detectáveis na seqüência. Assim, o conteúdo informativo máximo depende do número de nucleotídeos ou de aminoácidos da molécula e dos estados potenciais assumidos pelos caracteres (quatro nucleotídeos e vinte aminoácidos). Portanto, a análise comparativa de moléculas marcadoras permite somente uma primeira aproximação do curso da evolução bacteriana (LUDWIG e SCHLEIFER, 1999).

A análise de distância requer várias etapas para obter-se uma árvore filogenética final que possa representar a história evolutiva do indivíduo analisado

(CRUZ, 2001). É necessário construir esta árvore e avaliá-la, verificando similaridade ou não entre os indivíduos estudados (HERSHKOVITZ e LEIPE, 1998).

Antes do desenvolvimento deste processo é necessário, por se tratar de filogenia molecular, que se escolha uma molécula que leve em conta as semelhanças entre os microrganismos. A análise filogenética de DNA ou proteínas é uma importante ferramenta para estudar a história evolutiva dos microrganismos, uma vez que a taxa evolutiva das seqüências varia com o gene ou segmento de DNA (WILSON, CARLSON, WHITE, 1977), por estar sobre pressão de seleção, variando entre um gene ou outro, entre diferentes partes do mesmo gene, e entre uma linha e outra de descendentes. Isso significa que seqüências de nucleotídeos podem mudar rápido o suficiente para mostrar variação significativa ao nível intraespecífico (pseudogenes, ou sítios silenciosos de códons), considerando que as seqüências que são cruciais para funções altamente conservadas, permanecerão reconhecíveis. Esta variação de taxas permite compará-las, caso sejam bem escolhidas. Também significa que análises cada vez mais sofisticadas devem ser desenvolvidas para extrair ao máximo a informação filogenética (YONG, 1992).

A análise filogenética é, por outro lado, importante para estudar-se o padrão de famílias multigenes (ATCHLEY e ZHU, 1997), bem como para entender a evolução adaptativa ao nível molecular (JERMANN *et al.*, 1995). Esta técnica permite uma visão aprofundada do mecanismo de manutenção de alelos polimórficos em populações (TAKAHATA, 1993). Entretanto, existem duas razões pela qual a filogenia molecular pode falhar: a similaridade entre as seqüências pode não ocorrer devido à ancestralidade de um gene, que pode não ser representativa da história evolutiva do genoma como um todo. A evolução convergente é um problema menor para o genótipo do que para o fenótipo, uma vez que o mapa a partir do genótipo para o fenótipo é redundante (YONG, 1992).

A reconstrução de árvores filogenéticas usando métodos estatísticos foi iniciada, independentemente, em taxonomia numérica para caracteres morfológicos (SNEAT e SOKAL, 1973) e em genética de populações para os dados de frequência gênica (CAVALLI-SFORZA e EDWARDS, 1964). Alguns dos métodos estatísticos desenvolvidos para este propósito são ainda usados na análise filogenética de dados moleculares, mas recentemente novos métodos têm sido desenvolvidos. As relações genéticas são tradicionalmente representadas em um diagrama

denominado de “árvore”, devido à maneira com que os ramos das diferentes linhagens analisadas são arranjados, lembrando os ramos de uma árvore. Embora esta representação não mostre todas as possíveis variações da maneira como os organismos evoluem (ex: são incapazes de mostrar a transferência horizontal da informação genética), ela tem persistido, por ser, freqüentemente, uma aproximação e por ser a maneira mais facilmente tratada computacionalmente (GOLDMAN, 1997).

Diversas ferramentas para alinhar seqüências foram desenvolvidas nos últimos 25 anos, podendo-se dividi-las “grosseiramente” em GLOBAIS e LOCAIS, que por sua vez são separadas em métodos de alinhamento em PARES, por estudarem duas seqüências e MÚLTIPLO, mais de duas seqüências (ALTSCHUL, 1997; ALTSCHUL *et al.*, 1997). A maioria dos métodos de análise filogenética trabalha a partir de um grupo de seqüências alinhadas pelo método de alinhamento múltiplo, quando se quer estabelecer relações evolutivas de um grupo de organismos. Neste caso, as seqüências são dispostas cada uma numa linha, de modo que cada base seja colocada numa coluna chamada de sítio, que contenha esta mesma base em todas as seqüências, sem que, para isso, a estrutura primária da molécula seja alterada.

Para isso, aceita-se o pressuposto de que a semelhança entre as seqüências reflete a hipótese de homologia entre elas. A única alteração permitida é a introdução de espaços denominados falhas (“*gaps*”) que representam deleções de nucleotídeos, durante a evolução. Normalmente como não se tem informações sobre a ancestralidade em relação aos organismos nas análises filogenéticas, é válido pensar que as falhas possam representar inserções nas seqüências que não as possuem. Uma falha é difícil de interpretar em termos evolutivos, não havendo métodos confiáveis que possam usar a informação contida em seus padrões (GOLDMAN, 1997). Entre duas seqüências é possível encontrar diversas possibilidades para o alinhamento e este problema torna-se mais grave no alinhamento múltiplo. O número de comparações aumenta geometricamente em relação ao número de seqüências a serem alinhadas, tornando os cálculos impraticáveis, quando se trabalha com algumas dezenas de seqüências, mesmo em computadores com grande capacidade de análise. Por isso, a maior parte dos programas para esta finalidade utiliza um conceito denominado “alinhamento progressivo” (SANKOFF, 1975).

A idéia de alinhamento progressivo depende da existência de um relacionamento filogenético entre as seqüências, para que o alinhamento comece a ser feito entre as seqüências mais próximas e seja “progressivamente” conduzido, até que a seqüência mais distante seja incorporada. Este fato remete a um paradoxo: a análise filogenética de um grupo de seqüências depende do correto alinhamento entre elas e, da mesma forma, para se conseguir o alinhamento confiável é preciso ter um alinhamento prévio das relações filogenéticas entre as seqüências. Na prática, os programas mais usados, como o *Clustal W* (HIGGINS *et al.*, 1994), partem do alinhamento aos pares, montam uma matriz de similaridade entre todos os pares de seqüências e calculam a “árvore filogenética” grosseira para guiar o alinhamento múltiplo propriamente dito. Este método não garante que se tenha sempre o melhor alinhamento possível, mas torna-se tanto mais confiável.

Até o presente momento, dois elementos do modelo de substituição podem ser acessados para dados de nucleotídeos, mas não para dados de aminoácidos ou códons. Um deles é o modelo de substituição entre bases, e o outro a taxa relativa de substituição entre os diferentes sítios da seqüência. Variáveis mais complexas, como os modelos de substituição sítio-específico ou linhagens-específicas, não podem ser determinados (HERSHKOVITZ e IEIPE, 1998).

Para estabelecer o modelo de substituição entre bases é preciso quimicamente semelhante, ou seja, uma purina sendo substituída por outra purina (ex.: A.G) ou uma pirimidina substituída por outra pirimidina (ex.: C.T). A este tipo de substituição considerar dois tipos de substituições de bases, quimicamente distintos, que são observados no DNA. A primeira é aquela onde uma base é substituída por outra denomina-se TRANSIÇÃO. O segundo tipo é aquele que ocorre a substituição de bases quimicamente distintas, como uma purina sendo substituída por uma pirimidina (ex., A.C) ou vice-versa. A esse segundo tipo de substituição dá-se o nome de TRANSVERSÃO. A transversão normalmente é menos comum de que a transição (HERSHKOVITZ e IEIPE, 1998).

Na prática, a especificação das taxas relativas de substituições entre resíduos particulares normalmente tem a forma de uma matriz quadrada, com um número de linhas e colunas sendo igual a quatro para as bases do DNA. Estas matrizes podem determinar os “pesos” que serão aplicados às substituições pelos algoritmos de construção da árvore, como são feito quando se usa o método de Máxima

Parcimônia. Neste caso, onde a matriz de “pesos” é aplicada, o método é referido como “Parcimônia Ponderada”. Para os métodos de construção de árvores de distância e Máxima Verossimilhança, o “peso” dado às substituições pode ser derivado dos próprios dados, sendo a matemática envolvida mais complexa (HERSHKOVITZ e IEIPE, 1998).

O segundo elemento, a taxa relativa de substituição total entre diferentes sítios, também afeta os resultados da construção da árvore. O exemplo mais óbvio desta variação é aquela entre as três posições de códon, onde a terceira posição tende a ser a mais variável que as duas primeiras. Por esta razão, em algumas análises feitas a partir de seqüências codificadoras de proteínas, a terceira posição é excluída (HERSHKOVITZ e IEIPE, 1998). Variação entre sítios também é observada no 16S rRNA, entre as posições mais ou menos conservadas (VAN DE PEER, CHAPELLE, DE WACHER, 1996). Entretanto, as abordagens a esta questão são matematicamente mais complexas como no modelo não paramétrico (YANG *et al.*, 1996) e no modelo invariante e modelo de distribuição gama (SWOFFORD *et al.*, 1996). Estes modelos ainda não são rotineiramente empregados, mas o modelo de distribuição gama começa a ganhar força, na medida em que novos algoritmos têm sido desenvolvidos e disponibilizados nos pacotes de programas para análises filogenéticas.

Segundo Nei, Takezaki, Sitnikova (1995) e Nei (1996), considera-se atualmente a reconstrução de uma árvore filogenética como uma inferência estatística de uma verdadeira árvore filogenética, entendendo-se como “verdadeira” a real história evolutiva do grupo de organismo em estudo. Há dois processos envolvidos nesta inferência: “estimativa” da topologia ou do padrão de ramos de uma árvore e estimativa dos comprimentos dos ramos para uma dada topologia de árvore. Quando a topologia é conhecida, estimativas estatísticas do comprimento dos ramos são relativamente simples. O problema maior reside na estimativa ou reconstrução de uma topologia.

O número de topologias a serem analisadas aumenta rapidamente em relação ao número de organismos ou seqüências sendo comparados. Desta forma, analisando-se quatro organismos, existem apenas três possíveis topologias (considerando-se árvores sem raiz e ramos divididos dicotomicamente); quando este número aumenta para dez organismos, o número de topologias possíveis torna-se

gigantesco, sendo igual a 2.027.025; se o número de organismos é igual a vinte, o número de topologias possíveis atinge inimagináveis 8×10^{20} árvores (PENNY, 1991), o que seria impraticável de se calcular até mesmo em computadores de alta capacidade de processamento. Apesar dos fundamentos matemáticos em filogenia molecular não estarem bem estabelecidos, simulações por computador e dados empíricos indicam que os métodos atualmente usados, como *Neighbor-Joining*, Evolução Mínima e Parcimônia produzem árvores filogenéticas razoavelmente boas quando um número suficientemente grande de nucleotídeos é usado. Entretanto, quando a taxa de evolução varia extensivamente de ramo a ramo, muitos métodos podem falhar em recuperar a verdadeira topologia (NEI, 1996).

2.7 RELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS DIETÉTICAS, CLÍNICAS E MICROBIOLÓGICAS E O DESENVOLVIMENTO DA CÁRIE DENTAL

A cárie é uma doença infecciosa e transmissível porque é causada por bactérias que colonizam as superfícies dos dentes. Ao contrário da maioria das doenças infecciosas que afetam os seres humanos, ela é o resultado de um desequilíbrio da microbiota bucal nativa e não de um patógeno exógeno não nativo. A introdução de açúcar refinado na dieta das sociedades modernas abalou o equilíbrio entre saúde e doença. Novas compreensões sobre a história natural das principais bactérias cariogênicas, os *S. mutans*, podem contribuir com maneiras para controlar ou prevenir esta doença infecciosa (BARBIERE, 2005)

A análise comparativa de diferentes estudos quanto ao papel de diversos fatores dietéticos, clínicos e microbiológicos envolvidos no desenvolvimento da cárie dental é muito difícil e, certamente, sujeita a graves equívocos (BEIGHTON, 2005). Isto porque há grandes variações sócio-econômicas, ambientais, culturais e comportamentais entre as populações estudadas, diferenças estas que podem interferir na intensidade e forma com que cada fator influencia o desenvolvimento da doença cárie. Somando a isto, diferentes critérios são adotados aos fatores de risco, sejam eles comportamentais, clínicos ou microbiológicos (GRINDEFJORD *et al.*, 1991; HAUSEN, 1997; MATTOS GRANNER, 1999).

Segundo Hausen (1997), os estudos de predição de cárie visam identificar indivíduos que necessitariam tratamento individualizado para evitar o desenvolvimento

de um número inaceitável de lesões de cárie. Mesmo em populações que recebem atenção odontológica precoce, como é o caso das crianças engajadas no programa de prevenção de cárie da Bebê-Clínica da Universidade de Londrina - PR, há um grupo de indivíduos de alto risco que desenvolve lesões de cárie dental, a despeito de todos os cuidados preventivos (FRAIZ, 1998).

Variações nos fatores sócio-econômicos e culturais poderiam influenciar no risco de infecção por *S. mutans* (GRINDEFJORD *et al.*, 1991). Estes fatores podem se relacionar, por exemplo, com hábitos de consumo de sacarose. Assim, o consumo freqüente de sacarose pode favorecer a infecção por *S. mutans* como sugerem alguns estudos epidemiológicos realizados em crianças de um ano de idade (GRINDEFJORD *et al.*, 1991). O uso prolongado da mamadeira contendo sacarose, principalmente durante a noite, está associado à infecção precoce por *S. mutans*, ao acúmulo destes microorganismos no biofilme dental (VAN HOUTE, LOPMAN, KENT, 1996) e ao desenvolvimento severo de lesões de cárie dental em superfícies normalmente menos susceptíveis à carie dental, como as vestibulares e linguais dos incisivos superiores (RIPA, 1988). Restrições no consumo de sacarose podem, do mesmo modo, promover quedas significativas dos níveis de *S. mutans*, mesmo em microbiotas estabelecidas em indivíduos adultos (WENNERHOLM, BIRKED, EMILSON, 1995). No entanto, estudos realizados em populações caracterizadas pelo consumo de sacarose, como nas regiões de Turiani e Singida da Tanzânia, demonstram uma freqüência de *S. mutans* de 66% em crianças entre 1 e 3,5 anos de idade (MATEE *et al.*, 1993), superior à observada em países desenvolvidos, onde o consumo de sacarose é maior, como E.U.A e alguns países europeus. No presente trabalho, detectamos relação entre o consumo de sacarose e a manifestação clínica da doença (Apêndice 1). Assim, são necessários novos estudos que explorem diferentes fatores relacionados à infecção precoce por *S. mutans*. Por exemplo, pouca informação existe na literatura sobre as condições imunológicas de crianças altamente infectadas por *S. mutans* em idade precoce (RUSSELL *et al.*, 1999).

2.8 DIVERGÊNCIAS QUANTO AOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *S. mutans*

É importante considerar que a cárie dental é uma doença infecciosa que sofre influência de inúmeros fatores relacionados à suscetibilidade individual, resposta

imunológica, dieta, hábitos de higiene, uso do flúor, entre outros (BEIGHTON, 2005; BRATTHALL, 1992). Além disso, observa-se uma grande diversidade genética e fenotípica nas espécies do grupo *mutans*, a qual pode estar relacionada a variações na habilidade de colonização e indução de cárie dental por clones específicos dentro de uma mesma espécie (BOWDEN 1997; CAUFIELD, 1997). Kohler e Krasse (1990) observaram que isolados de *S. mutans* em crianças livres de cárie portadoras de altos níveis deste microrganismo, demonstraram baixa cariogenicidade em modelos animais, quando comparados com outros isolados de mesma espécie em crianças altamente infectadas e com altos índices de cárie dental. Outros estudos demonstram grande variabilidade na cariogenicidade de *S. mutans* isoladas de humanos em modelos animais (DE SOET *et al.*, 1991), mas pouco se sabe sobre os fatores bacterianos relacionados a estas diferenças (BOWDEN, 1997).

Estudos realizados na Finlândia sugerem que crianças com alta atividade de cárie apresentam uma grande diversidade de ribotipos de *S. mutans*, quando comparados com crianças livres de cárie (ALALUUSUA *et al.*, 1996). Não há um consenso sobre a relação de atividade de cárie e níveis de *S. mutans* com a diversidade genética de *S. mutans*. A frequência de múltiplos ribotipos não parece estar associada aos níveis bucais de *S. mutans* no biofilme dental de crianças da faixa etária de 1,5 a 3 anos de idade (ALALUUSUA *et al.*, 1996). Estudos sobre a diversidade genética de *S. mutans* são extremamente trabalhosos e caros, pois requerem a análise de grande número de isolados por indivíduo. Além disso, a proporção em que clones distintos colonizam a boca pode ser variável. A análise de clones através de PCR em um grande número isolados (trinta ou mais por indivíduo) demonstrou uma relação negativa entre a atividade de cárie e a diversidade de genótipos de *S. mutans*, sugerindo uma possível seleção de isolados mais virulentos em crianças com alta atividade de cárie dental (KREULEN *et al.*, 1997).

Emilson *et al.* (1987), demonstraram que linhagem isoladas de indivíduos pertencentes a uma população com baixíssima incidência de cárie eram capazes de induzir lesões de cárie avançadas em modelo animal. Os autores sugerem que a baixa atividade de cárie apresentada por esta população não se deve a ausência de virulência dos *S. mutans* que colonizam estas pessoas, mas por outros fatores, como a dieta. Kohler e Krasse (1990) observaram que linhagem de *S. mutans* isoladas de crianças livres de cárie portadoras de altos níveis de *S. mutans*

demonstraram baixa cariogenicidade em modelos animais, quando comparadas com outras linhagens de mesma espécie, isoladas de crianças altamente infectadas. Estas divergências encontradas na literatura demonstram a complexidade envolvida na expressão de virulência por microorganismos cariogênicos.

A detecção de um maior número de genótipos em isolados de indivíduos cárie-ativos e a maior capacidade destes isolados em sintetizar glucanos insolúveis a partir de sacarose, sugere esta ser uma importante característica de virulência associada à cárie dental. No entanto, são necessários estudos para uma maior análise dos genes *gtf* e das proteínas ligantes de glucanos (GBPs), na tentativa de compreender o papel de genes e proteínas ligantes com relação à cárie dental (NAPIMOGA, 2004).

3 OBJETIVOS

A partir de isolados de *Streptococcus mutans*, obtidos de amostra salivares de crianças das escolas municipais de Campo Largo assistidas pelo projeto de extensão em saúde bucal do Departamento de Patologia Básica, bem como da Clínica de Odontopediatria da UFPR, objetivou-se:

- caracterizar os isolados de *Streptococcus* do grupo Mutans por meio de marcadores morfológicos e bioquímicos;
- verificar o polimorfismo genético entre isolados de *S. mutans* por meio de marcadores RAPD;
- realizar ribotipagem por meio de sequenciamento da região intergênica (16S-23S) visando a identificação dos isolados de *S. mutans* separados geneticamente por meio de marcadores RAPD;
- diferenciar os isolados de *S. mutans* por meio do seqüenciamento de um segmento específico da enzima glicosiltransferase (gtf-B).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizadas isolados de *Streptococcus* do grupo mutans, obtidos da saliva de crianças procedentes das escolas rurais assistidas pelo projeto de extensão intitulado “Promoção de saúde em crianças das escolas rurais da rede municipal de ensino de Campo Largo e região metropolitana de Curitiba” do Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas, bem como da Clínica de Odontopediatria do Departamento de Estomatologia do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A linhagem ATCC de *S. mutans* 25175 foi gentilmente cedida pela Prof^a Maria Luiza Drechsei Fávero, do Departamento de Farmácia da UFPR; sendo que a linhagem 25175 da *American Type Culture Collection*, foi identificada como *S. mutans* Clarke, a partir do seu isolamento de dentina cariada. Como controle foi utilizado linhagens de *S. mutans* ATCC 25175 e UA159, linhagem de *S. sobrinus* ATCC 33478 e de *S. pyogenes* ATCC 13540.

4.2 CASUÍSTICA

Foram selecionadas para o estudo 30 crianças na faixa etária de três a doze anos, não levando em consideração raça e sexo. Estas crianças foram divididas em três grupos, com situação homogênea de risco social (condição social e econômica semelhante), sendo que destas, o grupo I era composto de crianças com dieta com muito açúcar, alta concentração de colônias de *S. mutans*/mL de saliva baseado nas unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e alta experiência de cárie; o grupo II era composto de crianças com dieta com muito açúcar, baixa concentração de *S. mutans* na saliva(UFC/mL) e alta experiência de cárie e o grupo III com crianças com dieta com pouco açúcar, baixa concentração de *S. mutans* na saliva(UFC/mL) e baixa experiência de cárie. (Apêndice 1). As crianças apresentavam dentição decídua ou mista, possuíam ou não experiência e atividade á cárie, que foi investigado pelo histórico da doença, através do índice CPOD (Índice de Dentes

Permanentes Cariados, Perdidos e Obturados) e ceod (dentes decíduos). (Apêndice 3). Todas as crianças possuíam permissão dos responsáveis através do termo de consentimento informado (Apêndice 2).

4.3 EXAME CLÍNICO

As crianças passaram por avaliação clínica, executada por um único examinador, que avaliou a presença de biofilme dental nas superfícies vestibulares dos incisivos, presença de cálculo dentário na superfície lingual dos incisivos inferiores, presença de lesões de cárie ativas, contagem de dentes perdidos por cárie ou obturados, segundo índices CPOD (para dentes permanentes) e ceo-d (para dentes decíduos) conforme casuística (Tabela 3). A presença de biofilme dental na superfície vestibular dos incisivos foi notada por exame visual, sem uso de evidenciadores de biofilme dental, sendo que quando existia biofilme visível, em dois ou mais incisivos, a criança era classificada positivamente para este fator; pouca (+) ou muito biofilme (++) e a presença cálculo dentário (+++).

4.4 ESTERILIZAÇÃO

Os meios de cultura e soluções foram esterilizados em autoclave, com pressão atmosférica de 1 atm por 20 min. Vidrarias foram autoclavadas por 40 min, frascos, ponteiras e tubos tipo Eppendorf foram autoclavados à pressão de 1 atm, por 15 min. Todo material contaminado foi esterilizado antes do descarte.

4.5 MEIOS DE CULTURA

4.5.1 Ágar Mitis Salivarius Sacaroso com Bacitracina e Telurito de Potássio (AMSB)

Ágar Mitis Salivarius	45g
Sacarose	15g
Água Destilada	500mL
Bacitracina (sol. Estoque 50.000 µg/mL)	0,30 mL
Telurito do Potássio(1%)	0,50 mL

O pH foi ajustado para 7,3 -7,4. Após a autoclavagem o meio foi resfriado até 45°C, acrescentou-se bacitracina, distribuiu-se em placas de Petri e armazenou-se sob refrigeração a 4 °C (GOLD *et al.*, 1973).

4.5.2 Ágar Sangue (Merck)

Ágar de infusão de cérebro e coração	52g
Água Destilada	1000mL

O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH 1N.

Após o resfriamento do meio a 50°C, acrescentou-se sangue desfibrinado de carneiro para uma concentração final de 5%.

4.5.3 Caldo BHI (Infusão de Cérebro e Coração) (Newprov)

BHI pó	37 g
Água Destilada	1000mL

4.5.4 Meio Todd – Hewit (Merck)

Infusão de coração	500g
Neopeptona (difco)	20g
Bacto-dextrose	2g
Cloreto de sódio	2g
Fosfato dissódio	0,4g
Carbono de sódio	2,5g

Foi dissolvido 30g em 1000 mL de água destilada.

4.6 SOLUÇÕES E REAGENTES

4.6.1 Solução Salina

NaCl	8,5 g
Água destilada	1000ML

4.6.2 Água Peptonada

Triptona	2,5g
Peptona	2,5g
NaCl	5,0 g
Água destilada	1000ML

4.6.3 DNA Polimerase (Invitrogen)

A Taq DNA polimerase foi utilizada nas reações de amplificação foi a da marca Invitrogen, na concentração de 5 U/ μ L

4.6.4 dNTP (Invitrogen)

Os quatro desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) em soluções estoques (100 mM), foram diluídos em água ultrapura para a concentração 2,5mM (solução de uso). Nas reações de amplificação, a concentração final utilizada foi de 0,2 mM de cada dNTP.

4.6.5 EDTA 0,5M

EDTA	37,22g
Água destilada	p/100ML
pH 8,0	

O EDTA foi pesado e acrescentou-se uma parte de água ultrapura autoclavada (aproximadamente 80% - 800mL) e o pH corrigido inicialmente com NaOH em pellet (aproximadamente 20 g) e o ajuste final com NaOH (4N). Para obtenção de EDTA 50mM, diluiu-se esta solução dez vezes. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

4.6.6 Gel de Agarose (0,8%)

Agarose	0,8 g
Tampão TEB 1X	100mL

4.6.7 Gel de Agarose (1,6%)

Agarose	1,6 g
Tampão TEB 1X	100mL

4.6.8 Oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*)

Os *oligonucleotídeo iniciadors* foram diluídos em tampão TE, obtendo-se a concentração final de 4 mM, usando o peso molecular do oligonucleotídeo iniciador individual dado pelo fornecedor. Os oligonucleotídeo iniciadors diluídos foram mantidos a -20°C.

4.6.9 Tampão da Amostra

Sacarose	40,0g
Azul de bromofenol	0,25g
Água destilada	100mL
Os ingredientes foram solubilizados e mantidos a 4°C.	

4.6.10 Tampão CTAB

Tris-base	2,42 g
Cloreto de sódio	8,2g
Na-EDTA	0,74g
CTAB	2,0g
Água ultrapura	80mL
pH 7,5	

A solução foi aquecida para que o Na-EDTA e o CTAB fossem dissolvidos e o volume completado para 100mL com água Ultrapura autoclavada.

4.6.11 Tampão de Corrida para Gel de Agarose (TEB 10X – pH 8,0)

Tris-base	54g
Ácido bórico	27,5g
EDTA 0,5M	20mL
Água ultrapura	p/500mL

4.6.12 Tampão Tris-EDTA (TE)

Tris-HCL (pH: 8,0)	20mM
EDTA	20mM

4.6.13 Solução de Brometo de Etídio

Foram dissolvidos 1,0% (p/v) de brometo de etídio em água destilada, agitando-se por várias horas (SAMBROOK; FRITCH; MANIATIS, 2002). A solução foi estocada à temperatura ambiente. Para revelação, foram diluídos 3 µL de brometo em 1000mL de água destilada.

4.7 COLETAS DE SALIVA

Foram realizadas coletas salivares não estimuladas, em recipientes plásticos, esterilizados, com tampa, instruindo a criança para que excretasse sua saliva dentro de recipientes até que o volume coletado fosse de aproximadamente 3 mL. Após homogeneização no local de coleta, 100 µL da saliva foi diluída em 900 µL de água peptonada, transportada em recipiente térmico com gelo, e mesma processada em até duas horas após coleta.

4.8 ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ESTIMATIVA DE *S. mutans* NA SALIVA

Para o isolamento de *S. mutans*, foi realizada diluição (10^{-1}) das amostras salivares em água peptonada, homogeneizadas em agitador magnético e 0,1mL da solução diluída foi semeada em ágar Mitis Salivarius adicionado de bacitracina (30 µg/mL de meio) e telurito de potássio (0,001%), e incubada a 37°C por 48 h, em microaerofilia, utilizando-se jarra de Gaspak.

Após incubação, foi realizada a estimativa das colônias de estreptococos do

grupo mutans multiplicando-se o número de colônias em uma área padronizada de 1 cm² pelo respectivo fator de diluição e pela área total da placa.

Duas a três colônias com morfologia característica de *S. mutans* foram repicadas em meios próprios para a realização de provas bioquímicas, e coradas pelo método Gram para análise de sua micromorfologia. A Figura 2 mostra as características macro e micromorfológicas dos estreptococos do grupo mutans. Em seguida, os isolados de *S. mutans* foram suspensos em glicerol 20% e congelados em freezer – 80°C.

4.8.1 Provas Bioquímicas para Identificação de *S. mutans*

A caracterização bioquímica de *S. mutans* seguiu os resultados das provas recomendadas para esta espécie apresentadas na Tabela 3.

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS DIFERENCIAIS DAS ESPÉCIES DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS, BASEADO EM PROVAS BIOQUÍMICAS E DE SENSIBILIDADE À BACITRACINA

Sorotipos / Provas	<i>S. mutans</i> c/e/f	<i>S. rattus</i> b	<i>S. cricetus</i> A	<i>S. sobrinus</i> d/g	<i>S. ferus</i> E	<i>S. macacae</i> E	<i>S. downei</i> h
Fermentação de							
Manitol	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	-	+	-
Produção de H ₂ O ₂	-	-	-	+	-	-	-
Hidrólise de Arginina	-	+	-	-	-	-	-
Esculina	+	+	d	d	+	+	-
Resistência à Bacitracina	+	+	-	+	-	-	-

FONTE: Adaptado de *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*

(*) Algumas linhagens podem dar resultados negativos; (**) algumas linhagens podem dar resultado positivo; d 11-89% das linhagens são positivas

4.8.1.1 Prova da catalase

A prova foi realizada colocando-se água oxigenada 3% sobre colônias características no AMSB, observando-se a formação de bolhas de gás (prova positiva).

4.8.1.2 Prova da fermentação do Sorbitol e Manitol

Foi adicionado 0,1mL de cultura pura, cultivada em meio base caldo BHI (Newprov), em um meio contendo manitol ou sorbitol e indicador de pH (púrpura de bromocresol). Os meios foram incubados a 37°C por 48 horas. A prova foi considerada positiva quando ocorreu a mudança da cor do indicado de pH do meio, de roxo para amarelo.

4.8.1.3 Prova da Hidrólise da Esculina

Foi semeado 0,1mL de cultura pura em Ágar Esculina Inclinado. Após incubação a 37°C por 48 h o desenvolvimento de coloração negra determinou a positividade da prova.

4.8.1.4 Prova da Hidrólise da Arginina

Foi adicionado 0,1 mL de cultura pura do microrganismo em meio base caldo BHI. contendo arginina e indicador de pH (púrpura de bromocresol). O tubo inoculado foi vedado com óleo mineral e incubado a 37°C por 48 horas. Inicialmente, a cor do meio altera para amarelo devido à acidificação pela fermentação da glicose presente no meio. Se a arginina é descarboxilada, pela presença da enzima dihidrolase, um produto final alcalino reverte o indicador para coloração púrpura, indicando a reação positiva.

4.9 ESTOQUE

Após isolamento e caracterização bioquímica, as amostras de *S. mutans* isoladas da saliva dos indivíduos pertencentes aos diferentes grupos de crianças, foram inoculadas em caldo BHI e incubadas por 24 horas, a 36°C. Após adição de

glicerol a 40% (para cada mL de material, acrescentou-se 1 mL de glicerol a 40%, resultando em uma concentração final de 20% de glicerol), as amostras foram congeladas a -80°C .

4.10 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com Vicente (2000), com modificações. As amostras foram previamente inoculadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas por 45h a 37°C . Após este período as culturas foram centrifugadas a 49000 X g por 2 min e o sedimento transferido a um tubo contendo uma mistura de sílica em pó (sílica gel Merck) e celite 2:1, em 600 μL de CTAB. Em seguida foram aplicados três pulsos (de 30 seg) de ultra-som (potência 70), com intervalos de 30 seg entre cada pulso, sob banho de gelo, utilizando desruptor de célula ultrassônico (Unique).

Foram, então, adicionados 400 μL de CTAB e as amostras incubadas em banho-maria a 65°C por 10 minutos. Após atingir temperatura ambiente, foram adicionados 1000 μL de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA) e os tubos centrifugados a 49000 x g por 7 minutos. O sobrenadante foi transferido a outro tubo, ao qual foram adicionados mais 1000 μL de CIA e a centrifugação repetida. Cerca de 2000 μL de álcool 96% gelado foram adicionados ao sobrenadante e os tubos incubados a -20°C por 30 minutos para precipitação dos ácidos nucleicos, e após este período foram centrifugados a 49000 x g por 7 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com álcool 70% gelado e repetida a centrifugação. O álcool foi retirado e os tubos vertidos em fluxo laminar até a secagem completa do precipitado. Posteriormente, foram adicionados 50 μL de água ultrapura para ressuspender o DNA. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 24 horas e armazenados à -4°C . A integridade foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose 0,8%, e visualizada com brometo de etídio em transluminador UV.

4.11 VARIABILIDADE GENÉTICA POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES

4.11.1 Amplificação do DNA por RAPD

Para a amplificação do DNA, foram utilizadas as condições descritas por PEREIRA *et al.* (2002), com modificações, utilizando uma mistura contendo os seguintes elementos: 1,5 unidades de Taq DNA polimerase; 0,4 mM de cada dNTP; 4,0 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂); 0,4 mM de oligonucleotídeos iniciadores ; 10 mM de tampão da enzima 1 x e 12 ng de DNA por 15 µL de reação.

As condições de amplificação foram realizadas de acordo com SPOLIDORO *et al.* (2003), com modificações. Foram utilizados 40 ciclos com as seguintes condições: 30s a 94°C; 30s a 36°C; e 1min a 72°C. Foram utilizados 5min a 94°C para desnaturação inicial e 3min a 72°C de extensão final.

Os oligonucleotídeos utilizados foram da linha *Operon Technologies* e suas respectivas seqüências podem ser visualizadas na Tabela 4.

TABELA 4 - SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Oligonucleotídeo iniciador	Seqüência
OPA – 2	5' TGCCGAGCTG 3'
OPA – 3	5' AGTCAGCCAC 3'
OPA – 5	5' AGGGGTCTTG 3'
OPA – 8	5' GTGACGTAGG 3'
OPA – 9	5' GGGTAACGCC 3'
OPA – 13	5' CAGCACCCAC 3'

FONTE: *Operon Technologies*®

4.11.2 Eletroforese

Os produtos resultantes da amplificação por RAPD foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,6%, sob voltagem constante de 3V/cm. O padrão de peso molecular utilizado foi o de 100 pb (DNA *Ladder* 100 pb, Invitrogen). O gel foi corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL (10 min) e as bandas observadas com auxílio de um transluminador de luz ultravioleta. A fotodocumentação foi feita pelo sistema de imagem digital (Multidoc-It).

4.11.3 Análise da Variabilidade Genética

Para análise do polimorfismo gerado pelos marcadores RAPD, foi utilizado o *software* NTSYS (*Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs*), de acordo com os princípios adotados em taxonomia numérica (ROHLF, 1988).

As bandas resultantes da amplificação foram analisadas com base em variáveis binárias, onde 0 indica ausência de banda e 1 presença. Utilizando o *software* NTSYS, a partir da matriz binária obtida, foi construída uma matriz de similaridade, utilizando o coeficiente de Jaccard (J). Este coeficiente permite calcular similaridades com base em variáveis binárias. As bandas foram consideradas como variáveis, enquanto as linhagens como unidades. O coeficiente foi calculado segundo a fórmula $J=M/P$, onde M é o número de concordâncias positivas, e o P o número total de variáveis, menos as concordâncias negativas (SNEATH e SOKAL, 1973).

A partir da matriz de similaridade, as unidades foram agrupadas através do método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*), para a construção dos dendrogramas. A confiabilidade dos grupamentos foi verificada pela análise *bootstrap* com 10000 reamostragens, segundo descrito por FELSENSTEIN (1985), utilizando o *software* Bood 3.03 (COELHO, 2005). Foram considerados consistentes os agrupamentos que apresentaram P maior ou igual a 75%, sendo P a frequência de determinado agrupamento no conjunto dos dendrogramas resultantes das repetições *bootstrap*. Para o estudo foram utilizadas 44 isolados de *Streptococcus mutans* e, como controle foram utilizados linhagens ATCC de *S. mutans* (25175) e UA cedida pelo do Departamento de Farmácia da UFPR, com seu isolamento feito à partir de dentina cariada, linhagem ATCC de *S. sobrinus* (33478) e ATCC de *S. pyogenes*; totalizando assim 48 amostras. A análise de variância dos marcadores RAPD foi realizada utilizando o programa Arlequin (SCHNEIDER; ROESSLI; EXCOFFIER, 2000).

4.12 REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO

Os DNAs das amostras de *S. mutans* foram submetidos à amplificação por PCR para sequenciamento. Dentre as 44 amostras estudadas, foram selecionadas por amostragem, 8 isolados de *S. mutans* correspondentes aos grupos genéticos

correlacionados à sua procedência, os dados clínicos, cárie dental, consumo de sacarose e uma linhagem ATCC de *S. mutans*. A reação de PCR foi realizada em um volume total de 50 µL, contendo 33,2 µL de água ultra pura; 5 µL tampão; 3 µL de cloreto de magnésio(MgCl); 4 µL de dinucleotídeo fosfato (DNTP) ; 0,8 µL de cada de cada oligonucleotídeo iniciador (sentido 3'-5' e reverso 5'-3'); 0,2 µL de Taq e 3 µL de DNA.. O programa de amplificação utilizado foi de 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguindo 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 59°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos (OHO *et al.*,2000). Os produtos de amplificação por PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,6 % . Após a amplificação o DNA foi corado com brometo de etídio e verificado em um transluminador UV. A purificação da PCR foi realizada utilizando PEG (polietilenoglicol) e precipitado com etanol em sucessivas centrifugações (MURPHY, BERG, EHLEMAN, 2005).

4.12.1 Reação de Sequenciamento da Região Intergênica (16S-23S)

Os produtos da PCR com o oligonucleotídeo iniciador universal para bactérias 13BF (5'-GTGAATACGTTCCCGGGCCT-3') e 6R (5'-GGGTTYCCCCRTTCRGAAT-3') (Chen *et al.* 2005), o quais amplificam fragmentos da porção do gene 16S RNAr, a região ITS, e pequena porção da região do gene 23S RNAr (Anexo 4) foi submetida à reação de sequenciamento, usando-se “**Big-Dye Thermocycle sequencing**”, sistema que utiliza a estratégia de marcação de cada nucleotídeo terminal com fluorocromo de cor diferente. Para sequenciamento da região intergênica 16S-23S, foram utilizados os mesmos *oligonucleotídeo iniciadors* sintetizados e purificados por *Invitrogen Life Technologies* em conformidade com Chen *et al.* (2005). As reações de sequenciamento consistiram de 1 a 3 µL dos produtos de PCR purificado, 0,5 µL de tampão; 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador; 0,5 µL do Big-Dye.; a completar um volume final de 10 µL a reação com água ultra pura. As reações de amplificação consistiam de 1 min a 96°C seguido de 35 ciclos a 96°C por 10 s em 50°C por 5 s e por 60°C por 4min para extensão final. Após liofilização em *SpeedVac* a 60°C por 40 min, as amostras foram seqüenciadas por eletroforese em ABI 377(*Applied Biosystems*).A edição nos dois sentidos (HALL, 2001) por meio do Standen Package (STADEN, JUDGE, BONFIELD,1998).

4.12.2 Reação de Sequenciamento do Gene *gtf-B*

Para sequenciamento do gene *gtf-B*, foram utilizados os iniciadores sintetizados e purificados por *Invitrogen Life Technologies*, em conformidade com OHO *et al.*(2000); GTFB – F (5' ACTTACACACTTTTCGGGTGGCTTGG 3') e GTFB – R (5' CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC 3'). As reações consistiram de 1 a 3 µL do produto de PCR purificado, 0,5 µL do tampão ; 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador e 0,5 µL do Big-Dye.; completando a reação para 10 µL de volume final com água ultra pura. As reações de amplificação consistiam de 1 min a 96°C seguido de 35 ciclos a 96°C por 10 s em 50°C por 5 s e por 60°C por 4min para extensão final. Após liofilização em *SpeedVac* a 60°C por 40 min, as amostras foram seqüenciadas em seqüenciador ABI 377(*Applied Biosystems*).A edição nos dois sentidos ,3'-5' e reverso 5'-3' , (HALL, 2001) foi feita por meio do Standen Package (STADEN *et al.*, 1998).

4.12.3 Análise das Seqüências da Região Intergênica (16S-23S) e *gtf-B*

As seqüências foram analisadas e corrigidas com o programa STADEN Package (STADEN, JUDGE e BONFIELD, 2001) e alinhadas com a versão do CLUSTAL-W (THOMPSON, HIGGINS, GIBSON, 1994) e MEGA 3 (KUMAR, TAMURA, e NEI, 2004). Para a obtenção da composição nucleotídica e aminoácida, cálculo das distâncias e posições nucleotídicas variáveis foi utilizado o programa MEGA 3 (KUMAR, TAMURA e NEI, 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE *S. mutans*

A partir do isolamento em AMSB, as colônias características de *S. mutans*, com macromorfologia de aspecto puntiformes, pequenas, médias e grandes foram selecionadas. Seguindo estes critérios foram isoladas 90 colônias a partir de amostras salivares das 30 crianças estudadas, obtendo uma média de três colônias por indivíduo, de diferentes morfologias. Entre as 90 colônias isoladas, um percentual de 49%, totalizando 44 isolados foi positivo para *S. mutans*.

Resultados semelhantes foram observados por Yoo *et al.* (2005), utilizando o meio ágar Mitis Salivarius acrescido de bacitracina, em que os autores verificaram, em 21 colônias típicas, que 12 não pertenciam ao grupo “mutans”, sendo identificadas por provas bioquímicas e moleculares como *S. anginosus*, *S. sanguis* e *Pantoea agglomerans*. Desta forma, os resultados sugerem a necessidade de padronização de outros critérios além da macromorfologia em meio seletivo para isolamento dos estreptococos do grupo “mutans”.

Emilson, Carlsson e Bratthall (1987) identificaram duas morfologias distintas de isolados de *S. mutans* em ágar Mitis Salivarius com bacitracina, sendo a primeira associada aos sorotipos c/e/f, tendo aparência de vidro estilhaçado; e a segunda de consistência mais cremosa e superfície granular, associada aos sorotipos d/g. De acordo com observações referentes ao isolamento de *S. mutans*, Barbieri (2005) relatou que a morfologia colonial entre os isolados foi bastante diferenciada, indicando assim a necessidade de selecionar para as provas bioquímicas não somente as colônias com a mesma característica morfológica, mas sim com várias morfologias encontradas.

A partir da caracterização bioquímica dos isolados, verificou-se, para cada criança analisada, o isolamento de uma a três colônias positivas bioquimicamente para *S. mutans*.

Com o critério de leitura analisado, observou-se que poucas placas apresentavam exclusivamente colônias com morfologia puntiforme (34%), porém esta morfologia juntamente com as médias (29,6%) foram as mais frequentes entre as

amostras observadas, seguida por colônias pequenas (25%) e colônias grandes prevalentes (11,3%) (Figura 4).

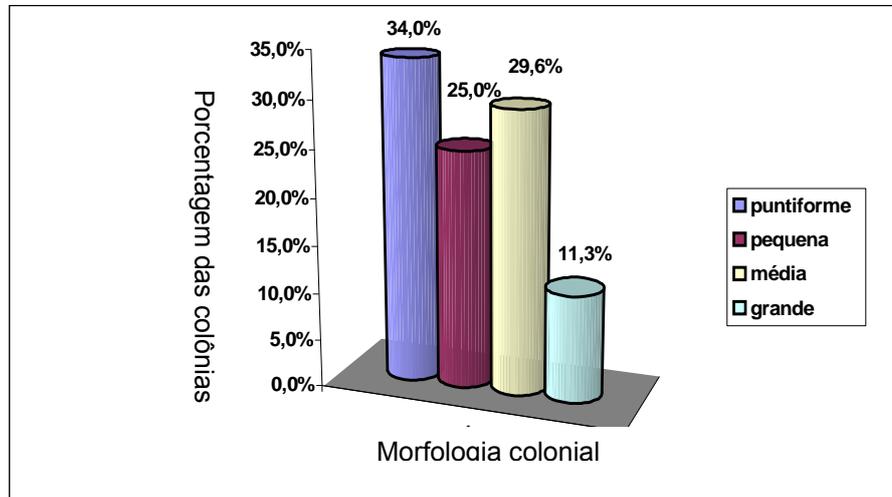


FIGURA 4 - VARIAÇÃO MACROMORFOLÓGICA DE *S. mutans* EM AMSB
 FONTE: o autor (2007)

A existência de variação morfológica pode sugerir a ocorrência de mais de um biossrotipo na boca (MOREIRA, 2006). Segundo Antony e Munshi (1997), os resultados obtidos pela estimativa de colônias presentes em amostras salivares podem ser graduados conforme: alta contagem (superior a 10^5 UFC/mL), intermediário (entre 10^3 e 10^5), e baixa contagem (inferior a 10^2 UFC/mL).

Entre as 30 crianças analisadas, 13 apresentavam uma alta concentração de *S. mutans* na saliva, em torno de 10^7 UFC/mL de saliva cultivada, enquanto que 17 crianças apresentavam em torno de 10^2 UFC/mL de saliva analisada.

Entre as crianças com alta contagem, todas apresentavam um alto histórico de ocorrência da doença. Tais resultados indicam que existe uma relação positiva entre concentração de *S. mutans* na saliva e a manifestação clínica da doença. No entanto, entre as crianças com baixa colonização, observou-se um grupo que, embora apresentasse baixa concentração de *S. mutans* na saliva, desenvolveu um histórico da doença (Tabela 5).

TABELA 5 - AVALIAÇÃO DA DIETA E COLONIZAÇÃO SALIVAR DE *S. mutans* EM CRIANÇAS COM DIFERENTES HISTÓRICOS DA DOENÇA CÁRIE

Fatores	Nº	Criança	Idade	Morfologia <i>S. mutans</i>	Diluição	CPOD	ceo	Biofilme	Cárie ativa	
>aç	01	A	3	Pe+q	0,00	0	4	++	Sim	
>UFC	02	B	3	punti	1/100	0	5	++	Sim	
>CA	03	C	8	peq	1/30	0	6	++	Sim	
Grupo I	04	D	4	punti	1/30	0	6	++	Sim	
	05	E	12	méd	1/20	4	--	++	Sim	
	06	F	8	peq	1/5	0	2	++	Não	
	07	G	4	méd	1/30	0	5	++	sim	
	08	H1	11	punti	1/50	12	--	++	Sim	
	09	H2	11	méd	1/50	12	--	++	Sim	
	10	I	4	méd	1/10	0	4	++	Sim	
	11	J1	7	gr	1/50	0	5	++	Sim	
	12	J2	7	méd	1/50	0	5	++	sim	
	13	J3	7	peq	1/10	0	5	++	Sim	
	14	K1	6	punti	1/50	4	5	++	Sim	
	15	K2	6	méd	1/50	4	5	++	Sim	
	16	L1	10	méd	1/50	1	7	++	Sim	
	17	L2	10	punti	1/50	1	7	++	Sim	
	18	M	7	punti	1/150	1	4	++	Sim	
>aç	19	N	6	punti	0,00	2	4	+++	Não	
<UFC	20	O1	11	peq	1/50	4	--	+++	Sim	
>CA	21	O2	11	punti	1/30	4	--	+++	Sim	
Grupo II	22	P	8	punti	1/100	0	2	+++	Não	
	23	Q	4	punti	0,00	0	4	+++	Sim	
	24	R	4	méd	1/20	0	5	+++	Sim	
	25	S1	4	punti	1/100	0	6	++	Sim	
	26	S2	4	méd	1/100	0	6	++	Sim	
	27	T	4	gr	1/5	0	2	++	Sim	
	28	U	7	punti	1/5	2	3	+++	Sim	
	<aç	29	V1	10	punti	1/30	0	--	+	Não
	<UFC	30	V2	10	méd	1/50	0	--	+	Não
<CA	31	W1	3	méd	1/50	--	0	++	Não	
Grupo III	32	W2	3	peq	1/30	--	0	++	Não	
	33	X1	5	méd	1/10	--	0	+	Não	
	34	X2	5	peq	0,00	--	0	+	Não	
	35	X3	5	gr	0,00	--	0	+	Não	
	36	Y1	4	méd	1/30	--	0	+	Não	
	37	Y2	4	gr	1/100	--	0	+	Não	
	38	Z	11	punti	1/30	0	--	+	Não	
	39	A	12	peq	1/50	0	--	+	Não	
	40	&	9	peq	1/100	0	1	+	Não	
	41	&	9	gr	1/200	0	1	+	Não	
	42	€	7	punti	1/100	0	1	+	Não	
	43	€	7	peq	1/70	0	1	+	Não	
	44	¥	11	peq	1/30	2	--	++	Não	

Legenda: + pouco biofilme dental, ++ muito biofilme dental, +++ presença de cálculo dentário; -- não se aplica; 0 á 1000 UFC (<UFC) e acima de 10000 UFC (>UFC); A a ¥ corresponde a diferentes crianças analisadas, > ou < aç = maior ou menor quantidade de açúcar na dieta; > ou < CA = maior ou menor histórico da doença cárie

De fato, sugere-se que os níveis de *S. mutans* consistem no fator mais eficaz na identificação de crianças de alto risco de cárie em idade precoce (GRINDEFFORD *et al.*, 1996) e são considerados úteis na identificação de crianças de risco à cárie, independente da presença ou ausência prévia de lesões de cárie (O'SULLIVAN e THIBODEAU, 1996).

Neste trabalho, os grupos I e III confirmam esta relação, por outro lado no grupo II isto não é observado, uma vez que crianças com baixo níveis de *S. mutans* desenvolvem a doença. Estes dados sugerem que o baixo nível de *S. mutans* na saliva não justifica o não desenvolvimento da cárie dental (alta especificidade) e a simples presença destes microrganismos, mesmo que em altos níveis, em desenvolverem a doença. Dados obtidos a partir de crianças livres de cárie e altamente infectadas por *S. mutans*, descritas em diferentes países (CARLSSON, OLSSON, BRATTHALL, 1985; MATEE *et al.*, 1993), corroboram com esta idéia. Além disso, pouco se conhece ainda sobre as variações nos fatores de virulência entre clones de *S. mutans* e sua relação com a atividade de cárie dental. Maiores estudos sobre este aspecto serão importantes para compreensão dos mecanismos pelos quais *S. mutans* colonizam os dentes e induzem a cárie dental, possibilitando, assim o desenvolvimento de novas estratégias preventivas e de identificação de indivíduos de risco (BOWDEN, 1997; CAUFIELD, 1997; BEIGHTON, 2005).

Diversos autores relataram tal relação (BARBIERE, 2005; BEIGHTON, 2005; BRATTHALL, 1992; MOREIRA, 2006). No entanto nos últimos anos vem se estabelecendo uma extensa discussão a respeito da existência de biovariantes em relação à virulência, os quais podem explicar a ocorrência de indivíduos pobremente colonizados com manifestação clínica da doença.

Alguns estudos demonstraram que existem diferenças na capacidade de produção de ácidos entre as diferentes espécies de estreptococos do grupo mutans. De Soet *et al.* (1991), observaram que os *S. sobrinus* eram mais acidogênicos do que os *S. mutans* em animais gnotóbicos. Köhler *et al.* (1995), detectaram diferenças na produção de ácidos entre linhagem de *S. mutans* isoladas de humanos. Embora tenham observado grandes variações entre linhagens de *S. mutans* isolados de diferentes indivíduos, os autores não foram capazes de associar o potencial acidogênico com o número de lesões de cárie presentes nos indivíduos colonizados por estes microrganismos.

Baixa cariogenicidade foi observada por Köhler e Krasse (1990) em linhagens de *S. mutans* isoladas de crianças livres de cárie portadoras de altos níveis de estreptococos do grupo mutans em modelos animais, quando comparadas com outras linhagens da mesma espécie, isoladas de crianças altamente infectadas e com altos índices de cárie dental. Outros estudos demonstraram grande variabilidade na cariogenicidade de linhagens isoladas de humanos em modelos animais (DE SOET *et al.*, 1991), mas pouco se sabe sobre os fatores bacterianos relacionados a estas diferenças (BOWDEN, 1997).

A influência de fatores de virulência de *S. mutans* e de *S. sobrinus* na capacidade de colonização e indução da cárie dental poderia ser mais facilmente observada em populações mais homogêneas quanto às características sócio-econômicas, hábitos dietéticos, de higiene bucal e exposição ao flúor (MATTOS-GRANER, 1999).

Tais resultados vêm de encontro com o observado para os indivíduos estudados neste trabalho, que apresentaram uma baixa contagem e uma alta incidência da doença. Porém, faz-se necessário ressaltar que a maioria das crianças analisadas possuía uma dieta hipersacarosada. Além disso, também foi observado que crianças com baixa concentração de *S. mutans*, baixo consumo de açúcar, apresentaram um histórico reduzido da doença.

Barbiere (2005) observou que crianças com alta concentração de *S. mutans*, alto consumo de sacarose e baixa manifestação clínica da doença associado à aderência *in vitro*, apresentaram *S. mutans* com um potencial de aderência inferior aos isolados provenientes de pacientes com alto histórico da doença.

5.2 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS

Diante da diversidade morfológica e numérica observada, os diferentes isolados foram estudados por meio de marcadores moleculares para comparar geneticamente os isolados de *S. mutans* provenientes da saliva de crianças com diferentes históricos da doença cárie. Foi realizado um estudo do polimorfismo por meio de marcadores RAPD, bem como a ribotipagem por meio de sequenciamento da região intergênica (16S-23S) do gene que codifica o DNAr, visando a identificação dos isolados separados geneticamente por meio de RAPD. Estes isolados foram também caracterizados por meio de sequenciamento parcial do gene que codifica a enzima GTF.

5.2.1 Caracterização Molecular dos Isolados de *S. mutans* por meio de marcadores RAPD

Os diferentes isolados foram inicialmente estudados por meio de marcadores RAPD onde foram utilizados seis oligonucleotídeos iniciadores, obtendo-se 102 marcadores, e o perfil de amplificação pode ser observado na Figura 5. De acordo com o perfil de amplificação obtido verificou-se polimorfismo entre os isolados provenientes de crianças com diferentes experiências à cárie, consumo de açúcar, bem como referente a colonização por *S. mutans* (alta e baixa UFC/mL de saliva).

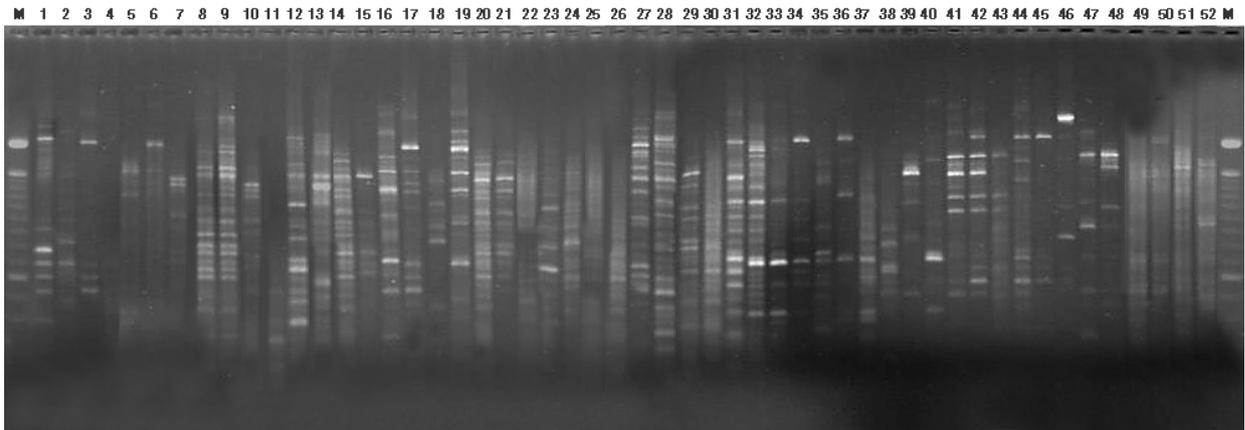


FIGURA 5 - MARCADORES RAPD DAS AMOSTRAS DE DNA DE *S. mutans* ISOLADOS DAS CRIANÇAS, UTILIZANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR OPA 5 (*Operon Technologies*)

Legenda: Eletroforese em gel de agarose a 1,4%. Amostras de número 1 a 44 isolados de *S. mutans* isoladas das 30 crianças estudadas, onde de 1 a 18 são do grupo I, de 19 a 28 são do grupo II e do 29 a 44 do grupo III; amostra 45 (UA 159) e 46 (25175) linhagens de referência do *S. mutans*; 47 linhagem de referência do *S. sobrinus*, 48 linhagem de referência do *S. pyogenes*, controle positivo (49,50,51,52) e M marcador de peso molecular (Ladder de 100pb)

A análise dos dados, utilizando o coeficiente de Jaccard e o método UPGMA (programa NTSYSpc 2.1), gerou um dendrograma que demonstrou a separação dos isolados em sete grupos com maior consistência e valores de *bootstrap* acima de 75% (Figura 6).

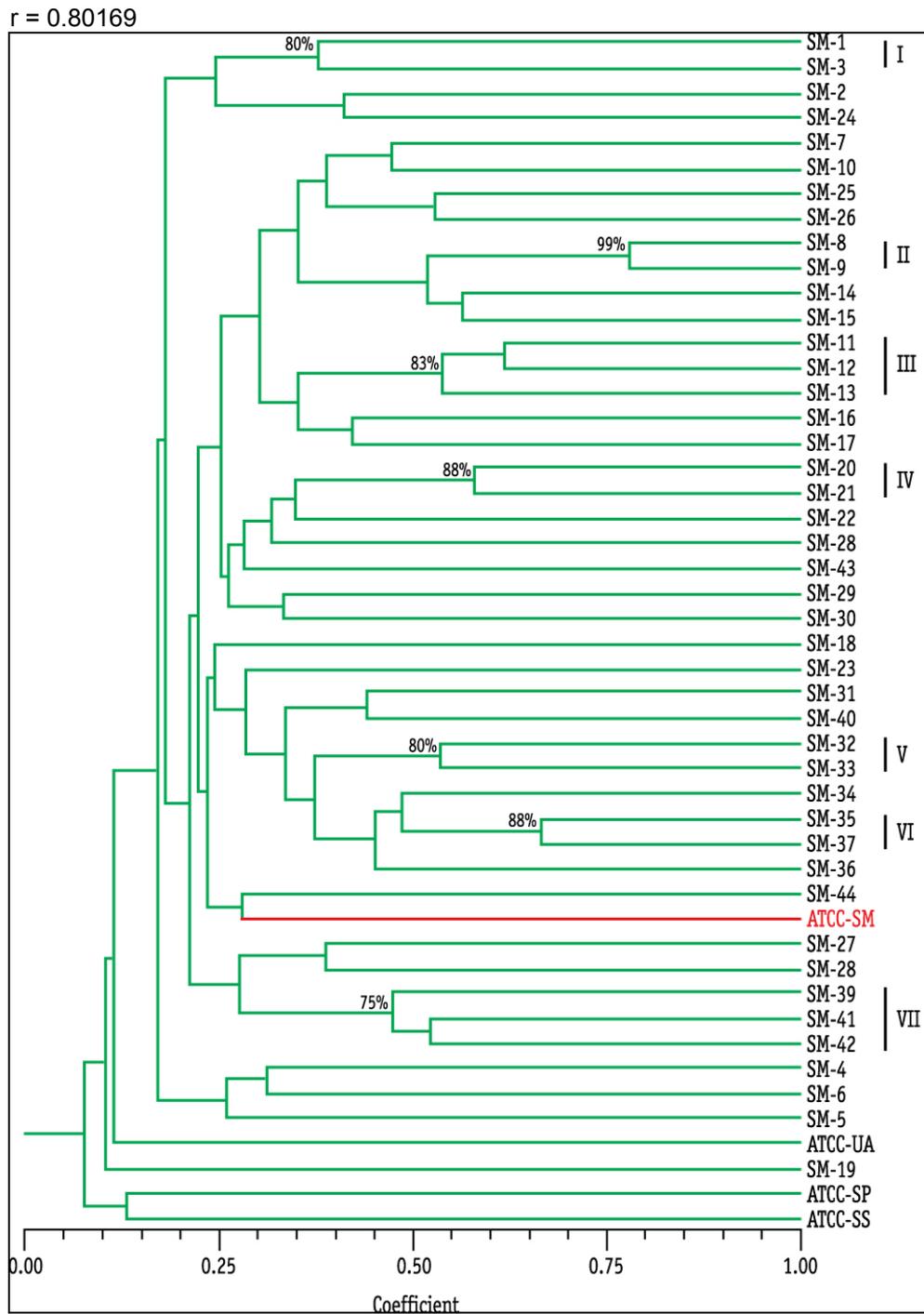


FIGURA 6 - DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DE SIMILARIDADE GENÉTICA OBTIDA POR MARCADORES RAPD DOS ISOLADOS, UTILIZANDO-SE O COEFICIENTE DE JACCARD E MÉTODO DE AGRUPAMENTO UPGMA

Legenda: Isolados de *S. mutans* de 1 a 44 provenientes da saliva das crianças pesquisadas; ATCC-SM e ATCC-UA linhagem referência de *S. mutans*, ATCC-SS linhagem de referência de *S. sobrinus* e ATCC-SP linhagem referência de *S. pyogenes*, como grupo externo, a % corresponde ao Bootstrap e o Coeficiente é de similaridade genética

De acordo com a Figura 6, os isolados foram agrupados em pelo menos 7 grupos. Os isolados SM-1 e SM-3 agrupados no grupo I eram provenientes de indivíduos distintos e apresentam similaridade genética aproximada de 40% (*bootstrap* 80%). Porém, no grupo II, reuniram-se linhagens SM-8 e SM-9 provenientes de um mesmo indivíduo, com similaridade de 75% (*bootstrap* 99%), assim como o grupo III reuniu as linhagens SM-11, SM-12 e SM-13 provenientes de um mesmo indivíduo, com similaridade genética de aproximadamente 50% e valor de *bootstrap* 83%. Os grupos I, II e III reuniram as linhagens provenientes de isolados de saliva de crianças com alto consumo de sacarose, alta contagem de UFC/mL de saliva e alta atividade de cárie. Dentre os isolados das amostras salivares das crianças com alto consumo de sacarose, alta atividade de cárie e baixa estimativa de UFC/mL de saliva, houve a formação de apenas um agrupamento, com valor significativo de *bootstrap* 88%, o grupo IV, que reuniu os isolados de um mesmo indivíduo SM-20 e SM-21 com similaridade de 57%. Este indivíduo deve ser multicolonizado, devido à baixa similaridade genética de seus isolados.

Os outros agrupamentos (grupos V, VI e VII) foram de isolados de crianças que apresentavam baixo consumo de sacarose, baixa estimativa de UFC/mL de saliva e baixa atividade de cárie. O grupo V (SM-32 e SM-33) reuniu isolados de amostras salivares de duas crianças com similaridade genética de aproximadamente 55% e *bootstrap* de 80%. O grupo VI (SM-35 e SM-37) reuniu isolados de amostras salivares de dois irmãos com similaridade genética de aproximadamente 65% e valor consistente de *bootstrap* de 88%. O grupo VII constituiu-se de isolados de amostras salivares de 3 irmãos (SM-39, SM-41 e SM-42), com similaridade de 47% e valor de *bootstrap* 75%.

No entanto, os agrupamentos que apresentaram um baixo valor de *bootstrap* sugeriram a existência de isolados feneticamente intermediários aos grupos.

As linhagens referência ATCC-SP e ATCC-SS, utilizadas como grupo externo, não apresentaram proximidade genética com os isolados estudados.

Existe pouca informação disponível sobre a relação entre a diversidade clonal e as características de virulência de *S. mutans*, assim como seu comportamento quando comparados indivíduos com diferentes experiências de cárie. No presente estudo não houve relação entre os isolados (genótipo), criança e manifestação

clínica da doença cárie, porém foi encontrado um maior número de genótipos em crianças com história de cárie.

Estudos e relatos têm demonstrado a existência de uma diversidade genética intraindividual de *S. mutans* (SAARELA *et al.*, 1996; ALALUUSUA *et al.*, 1996; GRONROOS e ALALUUSUA, 2000; REDMO-EMANUELSSON *et al.*, 2003), porém, não existe um consenso sobre a relação de atividade de cárie com a diversidade genética de *S. mutans*. Por ribotipagem, foi identificado mais de um clone de *S. mutans* entre as crianças que apresentavam cárie, enquanto apenas uma criança livre de cárie apresentou mais de um ribotipo, sugerindo que indivíduos com maior atividade de cárie apresentam maior diversidade de *S. mutans* (ALALUUSUA *et al.*, 1996).

Por outro lado, foi sugerido que clones específicos de *S. mutans* são selecionados em crianças com alta atividade de cárie (KREULEN *et al.*, 1997); porém não houve correlação com um maior número de genótipos. Já alguns trabalhos (HIROSE *et al.*, 1993; ALALUUSUA *et al.*, 1996; NAPIMOGA *et al.*, 2004) identificaram vários genótipos em indivíduos que tinham experiência de cárie. Acredita-se que a existência de múltiplos genótipos bacterianos na biofilme dental pode ser consequência de circunstâncias favoráveis à colonização de *Streptococcus* do grupo “Mutans”. Um ambiente mais propício poderia suportar este crescimento de múltiplos genótipos mais adaptados ao ambiente cariogênico, muito embora seja possível que a ação silmultânea de algumas bactérias com potenciais cariogênicos distintos possa elevar o risco de cárie. O biofilme dental é composto por uma comunidade bacteriana complexa, que alberga diversos microorganismos, inclusive *S. mutans*, a qual está exposta a diversas situações de estresse fisiológico, como excesso ou limitação de nutrientes, baixo pH, alta osmolaridade, oxidação e freqüente exposição a antimicrobianos, como considerado por Alaluusua *et al.* (1996).

A alta colonização e o aumento do número de genótipos são provavelmente, consequências da freqüência de consumo de carboidratos fermentáveis, e é possível que ações silmultâneas de diferentes genótipos com potencial cariogênico distintos possam aumentar o risco para o desenvolvimento da cárie dentária (ALALUUSUA *et al.*, 1996).

Observou-se que, na população estudada, circula uma grande diversidade de biossorotipos de *S. mutans*, em que alguns estão relacionados com maior ou menor manifestação clínica da doença. (Figura 7).

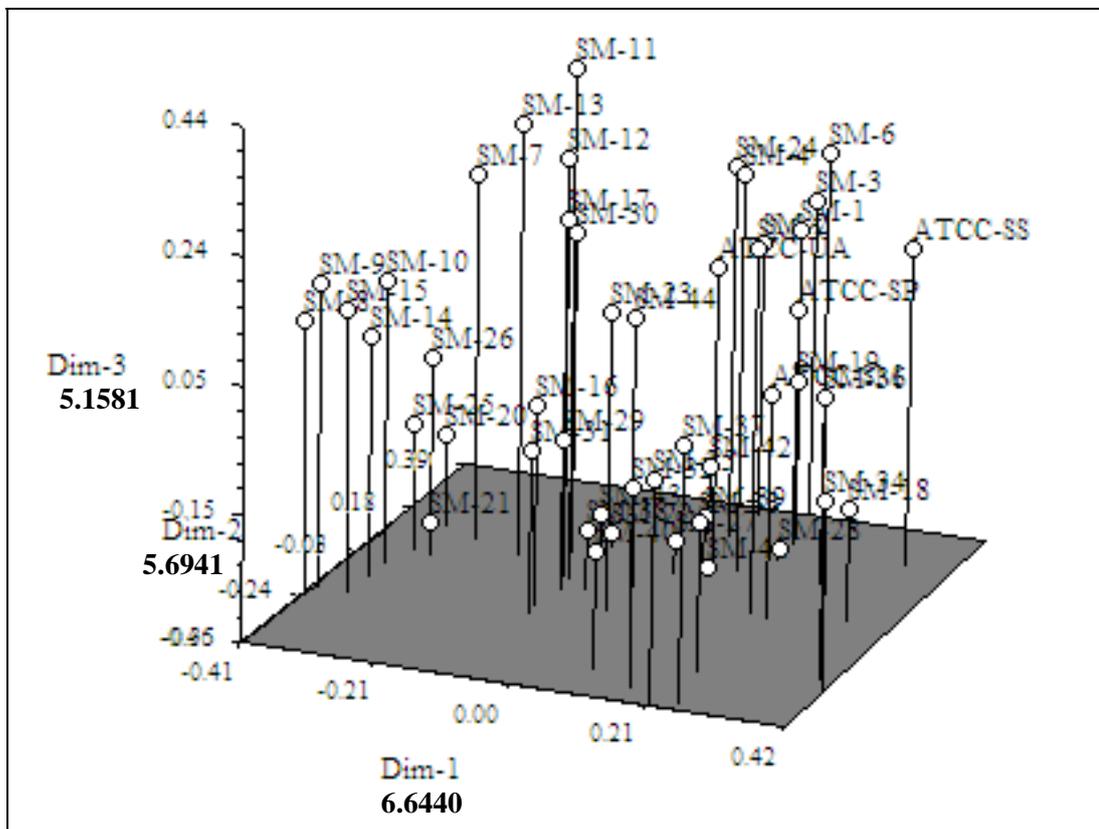


FIGURA 7 - ANÁLISE TRIDIMENSIONAL DOS ISOLADOS DE *S. mutans*

Legenda: Polimorfismo genético dos isolados de *S. mutans*.

FONTE: o autor (2007)

De acordo com a distribuição dos isolados visualizados no gráfico tridimensional (Figura 7), observa-se a alta variabilidade genética nas amostras estudadas.

5.2.2 Sequenciamento da Região Intergênica 16S-23S

A identificação dos isolados de *S. mutans* provenientes de diferentes grupos genéticos caracterizados por meio dos marcadores RAPD foi realizada por meio do sequenciamento da região intergênica (16S-23S).

Inicialmente, foram utilizados os *oligonucleotídeo iniciadores* específicos 13BF e 6R (CHEN *et al.*, 2005) para a realização da PCR da região de interesse. Os produtos da amplificação apresentaram bandas extranumerárias, indicando, assim, a baixa especificidade das condições de reação de PCR (Figura 8A). Sendo assim, foi realizada uma segunda PCR, a partir dos produtos de amplificação visualizados na Figura 8A e o perfil de amplificação obtido pode ser observado na Figura 8B.

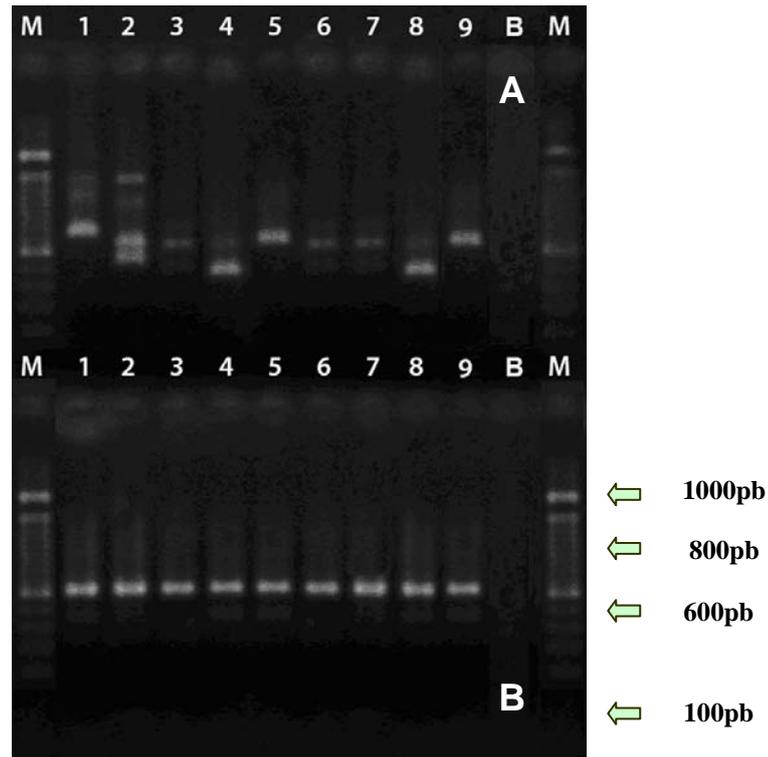


FIGURA 8 - PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA DE *S. mutans* ISOLADOS DAS CRIANÇAS, UTILIZANDO OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADOR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO INTERGÊNICA (CHEN *et al.*, 2004)

Legenda: M: marcador de peso molecular 1kb; 1: ATCC - *S. sobrinus*; 2 a 7 e 9: isolados de *S. mutans* pertencentes a diferentes grupos de acordo com marcador RAPD; 8: ATCC - *S. mutans* (25175); 10: branco

A partir do sequenciamento dos fragmentos apresentados na Figura 8B obteve-se seqüências com cerca de 660 pb, correspondente ao fragmento de interesse. As seqüências foram analisadas e corrigidas com o Programa STADEN Pakage (STADEN; JUDGE e BONFOELD, 2001) e alinhadas com a versão do CLUSTAL-W (THOMPSON; HIGGINS e GIBSON, 1994) e MEGA 3 (KUMAR; TAMURA e NEI, 2004). O resultado do alinhamento pode ser visualizado no Anexo 3.

Os amplicons foram seqüenciados de acordo com as condições estabelecidas por OHO, YAMSHITA, SHIMAZAKI (2000), obtendo fragmentos com longitude média de 656,6 pb (Tabela 6). De acordo com as porcentagens de bases nucleotídicas observadas entre os isolados analisados, verificou-se que as amostras apresentaram similaridade genética. Ao comparar-se os isolados com outra espécie, o *S. sobrinus*, percebe-se uma diferença no total de pares de bases nucleotídicas (Tabela 6).

De acordo com as seqüências intergênicas 16S-23S verificou-se similaridade entre as amostras seqüenciadas, tanto no padrão de amplificação demonstrado no gel de agarose, quanto na seqüência de nucleotídeos analisada, o que leva à confirmação de que estes isolados pertencem a espécie *S. mutans*.

TABELA 6 - PORCENTAGEM DE BASES NUCLEOTÍDICAS E LONGITUDE PARA O FRAGMENTO INTERGÊNICO (16S-23S) DAS AMOSTRAS DE *S. mutans* ESTUDADAS

	Isolados	T(U)	C	A	G	Total
Isolados de <i>S. mutans</i> analisados	1	23.0	20,1	29,4	27,5	657
	2	23,1	20,1	29,2	27,5	657
	6	23.1	20,2	29,1	27,5	657
	12	23.0	20,1	29,4	27,5	657
	18	23.1	19,9	29,4	27,5	657
	20	23.2	20,0	29,2	27,5	654
	37	23.1	20,1	29,2	27,5	657
	Média	23.1	20,1	29,3	27,5	656,6
<i>S. sobrinus</i> ATCC-33478	24.5	20,3	28,3	27,0	715	

FONTE: o autor (2007)

Os isolados 1, 2, 6, 12 e 37 são indivíduos com maior similaridade genética, sendo que os isolados 1 e 12 (Grupo I) são idênticos quanto às seqüências analisadas, apesar de serem isolados de indivíduos distintos, o que vem demonstrar que a mesma espécie pode manifestar-se de forma clinicamente semelhante quanto à doença cárie. Já os isolados 20 e 18 são geneticamente semelhantes para as seqüências analisadas e agruparam-se próximas dos isolados 1, 2, 6, 12 e 37.

Apesar de serem de grupos distintos, os isolados 18 e 20 são também semelhantes quanto à manifestação clínica da doença cárie. A linhagem ATCC *S. sobrinus* agrupou-se distante das amostras em estudo, o que demonstra não ser da mesma espécie dos isolados analisados (Figura 9).

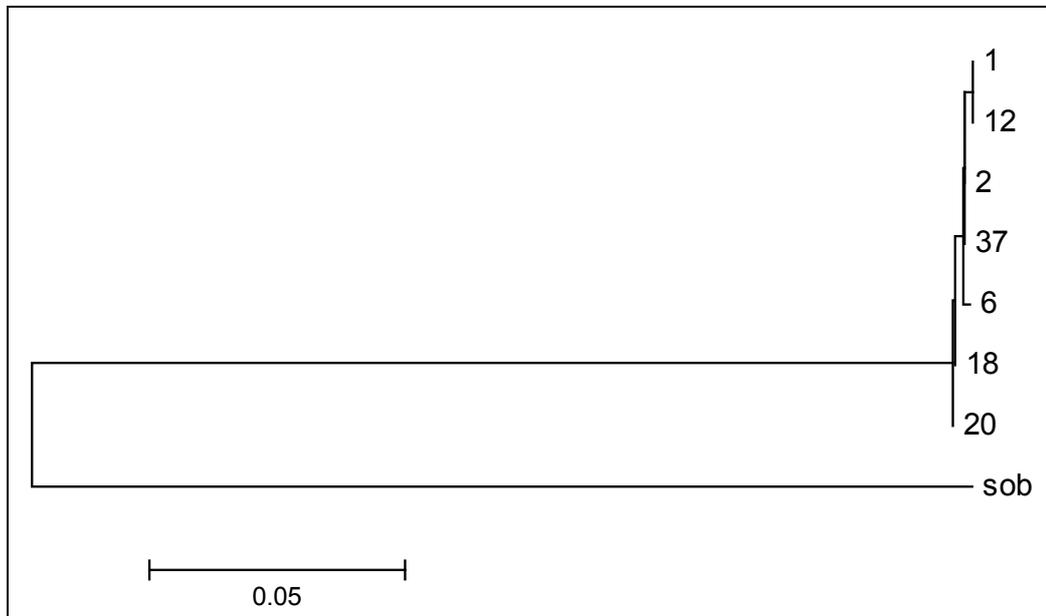


FIGURA 9 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *S. mutans* PROCEDENTES DE AMOSTRAS SALIVARES DE CRIANÇAS COM DIFERENTES HISTÓRICOS DE CÁRIE

FONTE: o autor (2007)

Legenda: Árvore filogenética pelo método Neighbor-Joinig (Kimura 2-parametros) para a região intergênica de *Streptococcus mutans* e linhagem de referência ATCC 33478 de *S. sobrinus*

5.2.3 Sequenciamento Parcial do Gene que Codifica a Enzima Glicosiltransferase (GTF)

Com o objetivo de comparar geneticamente os isolados em relação à manifestação clínica da doença, foi estudada a seqüência parcial do gene (região gtf-B) que codifica a proteína GTF, nos oito isolados de *S. mutans* pertencentes a diferentes grupos, de acordo com o histórico da doença e marcadores RAPD. Para o isolamento do fragmento de interesse foram utilizados os *oligonucleotídeo iniciadores* descritos por OHO, YAMSHITA, SHIMAZAKI (2000), em que obteve-se amplicons de aproximadamente 500 pb (Figura 10).

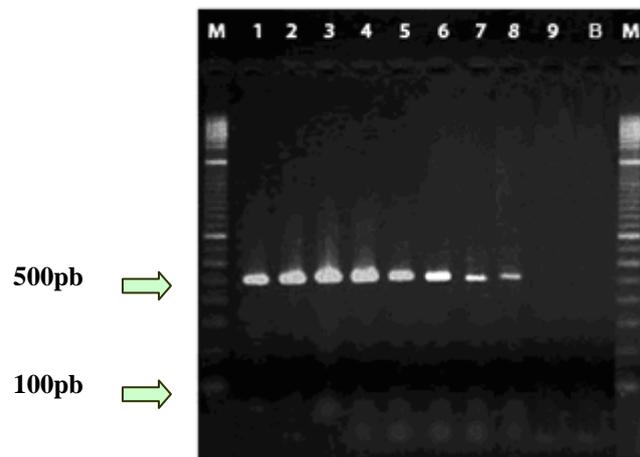


FIGURA 10 - PADRÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA DOS ISOLADOS DE *S. mutans* PROVENIENTES DAS CRIANÇAS, UTILIZANDO OS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES QUE FLANQUEIAM A REGIÃO ESPECÍFICA DO GENE GTF-B DA ENZIMA GLIGOSILTRANSFERASE (OHO *et al.*, 2000)

Legenda: M: marcador de peso molecular ladder 1kb; 1: ATCC - *S. mutans* (25175); 2 a 8: isolados de *S. mutans* pertencentes a diferentes grupos de acordo com marcador RAPD; 9: ATCC - *S. sobrinus* (33478); B: branco

Os amplicons obtidos foram seqüenciados de acordo com as condições estabelecidas por OHO *et al.* (2000), obtendo fragmentos com longitude de 493,3 pb (Figura 1 do Anexo I). De acordo com as variações nucleotídicas observadas entre os isolados analisados, verificou-se que a amostra 6 apresentou três inserções (TAT) nas posições 421, 422 e 423, respectivamente, resultando um alinhamento de 496 pares de bases (Tabela 7). Inserções envolvendo mais de um par de base não foram observadas entre as linhagens estudadas por Fujiwara *et al.* (1998).

De acordo com a Tabela 7, a porcentagem média de bases AT entre os isolados e a linhagem referência foi de 66,4%, sendo que as linhagens sequenciadas por Fujiwara *et al.* (1998) apresentavam uma porcentagem em torno de 66,1% (Tabela 7). Tais resultados demonstram que existem variações nucleotídicas entre isolados de *S. mutans* procedentes de diferentes regiões e/ou histórico clínico da doença.

TABELA 7 - PORCENTAGEM DE BASES NUCLEOTÍDICAS E COMPRIMENTO PARA O FRAGMENTO GTF-B DOS ISOLADOS E LINHAGEM REFERÊNCIA DE *S. mutans* E DAS SEQUÊNCIAS PUBLICADAS NO "GENBANK"

	Isolados	T	C	A	G	Total
Isolados de <i>S. mutans</i> analisados	1	28.6	16.0	37.7	17.6	493
	2	28.6	16.2	37.3	17.8	493
	6	28.8	16.1	37.5	17.5	496
	12	28.6	16.0	37.7	17.6	493
	18	28.8	16.0	37.7	17.4	493
	19	28.8	16.0	37.9	17.2	493
	20	28.8	16.0	37.7	17.4	493
	37	28.8	16.0	37.9	17.2	493
	ATCC	28.4	16.4	37.5	17.6	493
	Média	28.7	16.1	37.7	17.5	493.3
Fujiwara <i>et al.</i> , 1998	D89977	28.4	16.4	37.5	17.6	493
	D88660	28.8	16.4	37.3	17.4	493
	D88657	28.6	16.2	37.9	17.2	493
	D88654	28.4	16.4	37.5	17.6	493
	D886511	28.4	16.4	37.5	17.6	493
	Média	28.5	16.4	37.6	17.5	493
Média Geral	28.6	16.2	37.6	17.5	493.2	

FONTE: o autor (2007)

Legenda: Em preto estão os valores médios de cada base nucleotídea

De acordo com o observado na literatura, até o momento, não foram realizados estudos comparando a longitude e composição nucleotídica para o fragmento em estudo. Por este motivo, os resultados obtidos neste trabalho foram comparados com as seqüências publicadas no Genbank por Fujiwara *et al.* (1998). As amostras utilizadas para tais comparações foram: D89977, D88660, D88657, D88654, D886511, nas quais o fragmento para a comparação foi retirado do gene completo.

Dentre as sete mutações descritas neste trabalho, cinco apresentaram informações de parcimônia, enquanto que nas seqüências publicadas por Fujiwara *et al.*(1998) tal informação não foi observada (Tabela 8).

TABELA 8 - DIFERENÇAS NUCLEOTÍDICAS PARA O GENE *gtf*-B ENTRE OS ISOLADOS DE *S. mutans* E LINHAGENS REFERÊNCIAS UTILIZADAS (FUJIWARA *et al.*, 1998)

		Posição nucleotídica	Genótipo
		11111123334444	
Isolados		680367702560222	
		387710738918123	
		* *** *	
Isolados de <i>S. mutans</i>	1	TTCAGCGGAAAG---	A
	2GC.---	B
	6C.TAT	C
	12---	A
	18	..T...AAG.C.---	D
	19	..T...AA..C.---	E
	20	..T...AAG.C.---	D
	37	..T...AA..C.---	E
	ATCC	C.....C.---	F
		◆◆◆◆◆ ◆	
Fujiwara <i>et al.</i> , 1998	D89977	C.....C.---	F
	D88660	C..C.T...CT---	G
	D88657	CAT.T.A..C.---	H
	D88654	C.....C.---	F
	D886511	C.....C.---	F

FONTE: o autor (2007)

Legenda: . nucleotídeos semelhantes

- inserção/deleção

* posição com informação de parcimônia

◆ posição variável para as amostras publicadas no genbank

Para os isolados e linhagem referência de *S. mutans* 25175 sequenciadas, no presente estudo, seis diferentes genótipos foram detectados e denominados de **A** a **F** (Tabela 8). Fujiwara *et al.* (1998), ao sequenciarem cinco amostras de *S. mutans*, para este mesmo fragmento, encontraram três genótipos, sendo que em três

linhagens a seqüência é idêntica à da linhagem referência utilizada no presente estudo. Para os seis diferentes genótipos verificou-se presença de sete mutações decorrentes, principalmente, de inserções e ou deleções de um único nucleotídeo para a amioria dos isolados, com exceção do isolado 6 que apresentou uma alteração em 3 nucleotídeos seqüenciais na posição 421, provavelmente fruto de uma inserção de 3 pares de bases. Dentre as amostras estudadas por Fujiwara *et al.* (1998), foram encontradas mutações, porém decorrentes de inserções e deleções envolvendo apenas um único nucleotídeo.

Analisando as seqüências obtidas pelo método estabelecido por Kimura 2-parâmetros (STADEN; JUDGE e BONFIELD, 2001) foi possível estabelecer as distâncias nucleotídeas entre as linhagens analisadas considerando as mutações encontradas neste fragmento (Figura 11).

	1	2	6	12	18	19	20	37	ATCC
1		1 1	0 1	0 0	4 1	3 1	4 1	3 1	1 1
2	0.0041		1 0	1 1	5 0	4 0	5 0	4 0	2 0
6	0.0020	0.0020		0 1	4 0	3 0	4 0	3 0	1 0
12	<u>0.0000</u>	0.0041	0.0020		4 1	3 1	4 1	3 1	1 1
18	<u>0.0102</u>	<u>0.0102</u>	0.0082	<u>0.0102</u>		1 0	0 0	1 0	5 0
19	0.0082	0.0082	0.0061	0.0082	0.0020		1 0	0 0	4 0
20	<u>0.0102</u>	<u>0.0102</u>	0.0082	<u>0.0102</u>	<u>0.0000</u>	0.0020		1 0	5 0
37	0.0082	0.0082	0.0061	0.0082	0.0020	0.0000	0.0020		4 0
ATCC	0.0041	0.0041	0.0020	0.0041	<u>0.0102</u>	0.0082	<u>0.0102</u>	0.0082	

FIGURA 11 - DISTÂNCIAS NUCLEOTÍDICAS BASEADAS NA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS PARCIAIS DA REGIÃO *gtf-B* DOS ISOLADOS E LINHAGEM REFERÊNCIA DE *Streptococcus mutans*

FONTE: o autor (2007)

Legenda: Na parte inferior distâncias calculadas por Kimura 2-parâmetros e na parte superior distâncias por números de mutações. Em azul estão as transições e em vermelho as transversões. Sublinhado com duas linhas, as maiores distâncias nucleotídicas e em uma linha as menores

Ainda de acordo com a Figura 11, os isolados 18 e 20 demonstraram as menores distâncias nucleotídicas quando comparados par a par com os demais analisados neste estudo, apresentando também o maior número de transições. Com relação às mutações, as transições foram mais freqüentes que as transversões, quando comparadas par a par, o número de transições entre os isolados foi de um até cinco, enquanto as transversões ocorriam como um único evento.

Sendo assim, entre os isolados houve diferenças nucleotídicas para a região seqüenciada e essas diferenças permitiram agrupar os isolados (Figura 12).

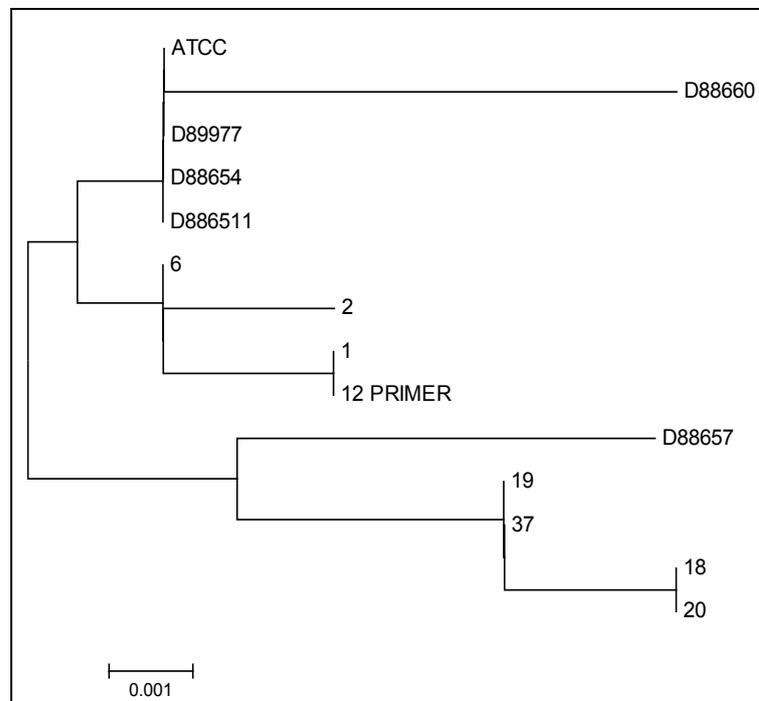


FIGURA 12 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE ISOLADOS DE *S. mutans* PROCEDENTES DE CRIANÇAS COM DIFERENTES HISTÓRICOS DE CÁRIE

Legenda: Árvore filogenética pelo método Neighbor-Joinig (Kimura 2-parâmetros) para sequenciamento parcial nucleotídico da GTF-B de *Streptococcus mutans*. ATCC 25.175 linhagem referências utilizada; 1, 2, 6, 12, 18, 20, 19, 18 – isolados; D88 a D89 seqüências nucleotídicas da região gtf-B de *S. mutans* depositadas no “Genbank”

De acordo com o alinhamento realizado para as seqüências da região gtf-B (Figura 12) verificou-se que a linhagem referência utilizada, ATCC, agrupou-se com as linhagens referências depositadas no “Genbank.” Os isolados 1, 2, 6 e 12 provenientes de indivíduos com o mesmo histórico da doença (Grupo I) foram reunidos em um mesmo grupo, onde verificou-se que os isolados 1 e 12 eram

idênticos quanto às seqüências analisadas, apesar de serem isolados de indivíduos distintos, porém com o mesmo padrão de manifestação clínica da doença. Enquanto a linhagem D88657 (FUJIWARA *et al.*, 1998) agrupou-se isoladamente e próxima dos isolados 18, 19, 20 e 37.

A partir do dendrograma (Figura 12) verificou-se que os isolados 20 e 18 são geneticamente semelhantes, apesar de pertencerem a grupos de indivíduos com diferentes padrões de colonização e estarem associados à manifestação clínica da doença. Isso sugere que a virulência dos isolados pode ser semelhante. Entretanto, os isolados 37 e 19, considerados geneticamente semelhantes para as seqüências analisadas, diferiram quanto aos grupos epidemiológicos e manifestação clínica da doença, indicando que fatores endógenos e exógenos do hospedeiro também podem influenciar no desenvolvimento da doença.

Para o fragmento analisado foram descritos 165 aminoácidos, sendo que a análise das porcentagens dos aminoácidos para o gene *gtf-B* não detectou a presença de Cisteína, Metionina e de Triptofano (Tabela 2 do Anexo 2). A ausência destes aminoácidos também foi observada nas seqüências publicadas por Fujiwara *et al.* (1998).

Os isolados analisados apresentaram variações na seqüência de aminoácidos e os resultados estão apresentados na Tabela 9.

TABELA 9 - DIFERENÇAS AMINOACÍDICAS PARA O GENE *gtf-B* ENTRE OS ISOLADOS DE *S. mutans* E AS LINHAGENS REFERENCIAS UTILIZADAS (FUJIWARA *et al.*, 1998)

		Posição amino-	11111
		cidica	33455612234
Amostras			06647800161
			* ** *
Isolados/linagem referencia ATCC	1	SAQSSSTNIK-	
	2SL.-	
	6L.Y	
	12-	
	18	.V...NA.L.-	
	19	.V...NA.L.-	
	20	.V...N..L.-	
	37	.V...N..L.-	
	ATCCL.-	
		◆◆◆◆◆	◆
Fujiwara <i>et al.</i> , 1998	L.-	
	D89977	..P.F...LN-	
	D88660	TV.I....L.-	
	D88657L.-	
	D88654L.-	
	D886511L.-	

FONTE: o autor (2007)

Legenda: . nucleotídeos semelhante

- inserção/deleção

* posição com informação de parcimônia

◆ posição variável para as amostras publicadas no genbank

Observando-se a Tabela 9, apenas o isolado 6 apresenta a adição de um aminoácido (Tirosina), devido a três inserções (TAT) nas posições 421, 422 e 423 (Tabela 8). Na posição aminoacídica 30 (Tabela 9), apenas a amostra D88657 apresentou um aminoácido diferente, Treonina, enquanto os demais apresentaram Serina.

Os isolados 1, 2, 6 e 12 ; a linhagem ATCC25175 de *S. mutans* e as seqüências das diferentes linhagens extraídas do “genbank” como fonte de comparação, apresentavam Alanina na posição 36, enquanto os outros isolados e a linhagem D88657 apresentaram Valina (Tabela 9).

Da mesma forma, os isolados e as linhagens referencias apresentam Glutamina na posição aminoacídica 46, com exceção da linhagem D88660 que apresentou Prolina. Nas posições aminoacídicas 54 e 57 os isolados e linhagens referências apresentavam o mesmo aminoácido, Serina, exceto a linhagem D88657 que apresentava alteração para a Isoleucina e a D88660 para Fenilalanina (Tabela 9).

Para os isolados 18, 19, 20 e 37 foram observadas diferenças na posição aminoacídica 68 com alteração do aminoácido para Asparagina enquanto as demais amostras analisadas apresentavam Serina (Tabela 9).

Os isolados 18 e 20 apresentam Alanina na posição aminoacídica 110 e o restante das amostras apresentaram a Treonina (Tabela 9). E o isolado 2 apresentou Serina na posição aminoacídica 120, sendo que os demais apresentaram Asparagina (Tabela 9).

Os isolados 1 e 12 apresentam alteração do aminoácido Isoleucina na posição aminoacídica 121 (Tabela 9), enquanto que as demais amostras apresentam Leucina. E na posição aminoacídica 136 (Tabela 9) apenas a amostra D88660 apresentou um aminoácido diferente, Asparagina, sendo que as demais apresentaram Lisina.

A partir desses resultados sugere-se que as posições aminoacídicas de 30 a 136 são regiões passíveis de variações do gene *gtf-B* de *Streptococcus mutans*.

De acordo com a literatura, a existência de polimorfismo nos genes *gtfs* expressos por diferentes linhagens de *S. mutans* (CHIA *et al.*, 1991; YAMASHITA *et al.*, 1992) poderia estar associada às variações na atividade enzimática específica (CHIA *et al.*, 1991). Alterações de um único aminoácido dentro do domínio catalítico das GTFS provocadas por mutagênese sítio-dirigida são capazes de alterar sensivelmente a atividade enzimática, promovendo diferenças no padrão de aderência em superfície lisa entre as linhagens de *S. mutans* estudadas (CHIA *et al.*, 1998).

Sendo assim, é importante ressaltar que o isolado 6 apresentou na posição aminoacídica 141a inserção do aminoácido Tirosina, diferindo dos demais (Tabela 9). Tal modificação gerou uma variação aminoacídica, podendo influenciar na atividade da enzima, uma vez que existem relatos indicando que esta posição é considerada a mais conservada da GTF-B justamente por se encontrar dentro do domínio catalítico (CHIA *et al.*, 1998; FUJIWARA *et al.*, 2002). Tal resultado pode ser associado ao padrão de virulência do isolado, o qual foi obtido de um indivíduo com um histórico alto de manifestação clínica da doença. A análise intraespecífica, utilizando o alinhamento das seqüências de fragmentos da GTF-B dos isolados e linhagens referências demonstrou diferenças nas bases nucleotídeas, sugerindo que tais alterações podem influenciar o padrão de virulência dos isolados justificando, assim, as variações observadas nos níveis de colonização dos indivíduos e manifestação clínica da doença.

Assim, estudos posteriores se fazem necessários, como testes de aderências *in vitro*, visando complementar os resultados obtidos e, conseqüentemente, fornecer dados a respeito dos diferentes fatores relacionados à doença cárie. A extensão da análise dos genes *gtf* representa um caminho para a elucidação do papel deste fator na virulência e manifestação clínica da doença cárie.

Novas compreensões sobre a história natural da principal bactéria cariogênica, o *Streptococcus mutans*, bem como uma maior análise dos genes *gtf* na tentativa de compreender o papel dele com relação à cárie dental, podem contribuir com métodos de controle ou prevenção desta doença infecciosa.

6 CONCLUSÕES

- A caracterização morfológica e bioquímica utilizada permitiu a identificação de *S. mutans* entre isolados do grupo Mutans a partir de amostras salivares;
- A variabilidade genética encontrada entre os isolados de *S. mutans*, sugeriu uma associação entre genótipo, criança e manifestação clínica da doença cárie;
- A existência de grupos associando crianças com alta manifestação clínica da doença e baixo índice de *S. mutans* na saliva, demonstra que se deve considerar, além dos fatores exógenos, a existência de variação quanto à virulência entre os biossorotipos selvagens de *S. mutans*;
- O sequenciamento da região intergênica do DNAr dos isolados analisados, permitiu confirmar a espécie *S. mutans* por meio da similaridade genética dos isolados;
- O sequenciamento parcial do gene que codifica a enzima GTF, permitiu a detecção de cinco diferentes genótipos, em que isolados com diferenças nas seqüências nucleotídicas apresentaram variações aminoacídicas, as quais podem justificar as diferenças no padrão de virulência dos isolados.

REFERÊNCIAS

- ABO, H.; MATSURA, T.; KODAMA, T.; OHTA, H.; FUKUI, K.; KATO, K.; KAGAWA, H. Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water insoluble glucan synthetase). **J. Bacteriol.**, v.173, n.3, p.989-996, Feb. 1991.
- ADJIC, D.; MCSHAN, W M.; MCLAUGHLIN, R. E. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA 159, a cariogenic dental pathogen. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, p14434-14439, 1999.
- ALALUUSUA, S.; RENKONEN, O. V. *Streptococcus mutans* establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 91, n. 6, p. 453-457, Dec. 1983.
- ALALUUSUA, S.; MATTO, J.; GRONROOS, Ç.; INNILA, S.; TORKKO, H.; ASIKAINEM, S.; JOUSIMIES-SOMER, H.; SAARELA, M. Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. **Arch. Oral Biol.**, v.41, p.167-73, 1996.
- ALALUUSUA, S.; GRONROOS, L.; ZHU, X.; SAARELA, M.; MATTO, J.; ASIKAINEN, S.; FUKUSHIMA, K. Production of glucosyltransferases by clinical mutans streptococcal isolates as determined by semiquantitative cross-dot assay. **Arch. Oral Biol.**, v.42, n.6, p.417-422, June 1997.
- ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artemed, 2004, 1463p.
- ALTSCHUZ, S.F. Phylogenetic estimation. In BIOSHOP, m.j.; RAWLINGS, C.J. (eds). **Dna and protein sequence analysis** – a practical approach. New York, IRL Press, p.279-312, 1997.
- ALTSCHUZ, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic. Acid. Res.** Oxford, v.25, p.3389-3402, 1997.
- ANTONY, U.; MUNSHI, A. K. Sibling versus maternal *Streptococcus mutans* levels as related dental caries. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v.21, p.145-150, 1997.
- ATCHLEY, R.; ZHU, J. Developmental quantitative genetics conditional epigenetic variability and growth in mice. **Gen.**, v.147, p.765-776, 1997.
- AZEVEDO, R. V. P.; NELSON FILHO, P.; ASSED, S.; ITO, I. Y. Strptococci of the mutans group: Isolation, Identification, and prevalence of species in the saliva of mother-child pairs. **Rev. Odonto. USP**, v.12, n.1, São Paulo, Jan/mar. 1998.
- BARBIERI, D. S.V. **Análise da aderência “in vitro” de *S. mutans* e *Candida albicans* na superfície dentária**. Curitiba, 2005. 92p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná.

BEIGTON, D.; RIPPON, H. R; THOMAS, H. E .C. The distribution of *Streptococcus mutans* serotypes and dental caries in a group of to 8-year-old Hampshire schoolchildren. **Br. Dent. J.**, p.162:103-106,1987.

BEIGTON, D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. **Community dent Oral Epidemiol.**,v.33 p.248-255, 2005.

BENTLEY, R W.; LEIGH, J. A.; COLLINS, M. D. Intragenic structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. **International J. System Bact.**, v.41, n4, p.487-494, oct. 1991.

BOWDEN, G. H. Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? **Community Dent Oral Epidemiol**, v.25,n.1, p.76-81, Feb. 1997.

BRADSHAW, D. J.; MARSH, P. D. Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. **Caries Res.**, v.32, n. 6, p. 446-462, nov/dec. 1998.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. EMBRAPA-Cenargen, Brasília, 309p., 1998.

BRATHALL, D.; CARLSON, J. *Clinical Microbiology of human saliva*. Florida, **CRS Press**, Boca Raton, 1988.

BRATTHALL, D. Caries, views and perspectives. **Scand. J. Dent. Res.**, v.100, n.1, p.47-51, Feb.1992.

CARLSSON, P.; OLSSON, B.; BRATTHALL, D. The relationship between the bacterium *streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique. **Arch. Oral Biol.**, v.30, n.3, p.265-268, 1985.

CAUFIELD, P. W., WALKER, T. M. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphism. **J. Clin. Microbiol.**, v.27, p.274-278, 1989.

CAUFIELD, P. W. Dental caries – a transmissibilidade and infectious disease revisited: a position paper. **Pediatr. Dent.**, v,19, p.491-498,1997.

CAUFIELD, P. W.; CUTTER, G. R.; DASANAYAKE, A. P. Inicialacquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **J. Dent Res.**, v.72,n.1,p.37-45,1993.

CAVALLI-SFORZA, L.L.; EDWARDS, A.W.F. Analysis of human evolution. In: **GENETICS TODAY**, 11 th, 1964. **Proc. Int. Congr.Genet.** The Hague, The Netherlands: Pergamon, p. 923-933, 1964.

CHEN,C.C.; TENG,L.J.; KAIUNG, S. E CHANG, T.C. Identification of clinically relevant viridans streptococci by an oligonucleotide array. **J. Clin. Microbiol**, v.43 p.1515-1521, 2005.

CHIA, J. S.; HSU, T. Y.; TENG, L. J.; CHEN, J. Y.; HAHN, L.J.; YANG, C. S. Glucosyltransferase gene polymorphism among *Streptococcus mutans* strains. **Infect Immun**, v.59, n.5, p.1656-1660, may 1991.

CHIA, J. S.; HSU, T. Y.; TENG, L. J.; CHEN, J. Y. Functional analyses of a conserved region in glucosyltransferases of streptococcus mutans. **Infect. Immun.**, v.66, n.10, p.4797-4803, Oct. 1998.

COELHO, A. S. G. Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstraps. **BOOD 3.03**. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO, 2005.

CORREA, M.S.N. **Odontopediatria na Primeira Infância**. 1ª ed. São Paulo: Editora Santos, 679p., 1998.

CRUZ, L.M. **Caracterização e análise filogenética molecular, de novos isolados fixadores de nitrogênio**. Dissertação de mestrado. Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, UFPR, Curitiba, 171p., 2001.

DE SOET, J. J.; VAN LOVEREN, C.; LAMMENS, A. J.; PAVICIC, M. J. A. M. P.; HOMBURG, C. H. E.; TEN CATE, J. M.; DE GRAFF, J. Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. **Cari Reseach**, v.24, n.2, p.116-112, 1991.

DEMERS, M.; BRODEUR, J. M.; SIMARD, P. L.; MOUNTON, G. V.; FRÉCHETTE, S. Caries predictors suitable for mass-screening in children: a literature review. **Commun. Dent. Health**, v.7, n.1, p.11-21, Mar., 1990.

DUCHIN, S.; VAN HOUTE, J. Colonization of teeth in humans by streptococcus mutans as related to its concentration in saliva and host age. **Infect. Immun.**, v.20, p 120-125, 1978.

EMMANUELSON, I. M. *Mutans* streptococci in families and on tooth sites. Studies on the distribution, acquisition and persistence using DNA finger printing. **Swed-Dent. J. Suppl.**, v.148, p.1-66, 2001.

EMILSON, C.G.; CARLSSON, P.; BRATTHALL, D. Strains of mutans streptococci isolated in a population with extremely low caries prevalence are cariogenic in the hamster model. **Oral Microb. Immun.**, v.2 p.183-186, 1987.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approaching using Bootstrap. **Evol.**, n.39, p.783-791, 1985.

FERREIRA, M.A.J.F. **Sistema reprodutivo e potencial para o melhoramento genético de uma população de melancia *Citrullus lanatus*** Piracicaba: ESALQ, 2000. 148 p. (Tese doutorado).

FOX, G.E.; STACKEBRANDT, E.; HESPELL, R.B.; GIBSON, J.; MANILOFF, J.; DYER, T.A.; WORFE, R.S.; BALCH, W.E.; TANNER, R.S.; MAGRUN, L.J.; ZABLEN, L.B.; BLANKEMORE, R.; GUPTA, R.; BONEN, L.; LEWIS, B.J.; STHAL, D.A.; LUERHRSEN, K.R.; CHEN, K.N.; WOESE, C.R. The phylogeny of prokaryotes. **Sci.**, Eashigton, v.209, p.457-463, 1980.

FRAIZ, F. C. **Estudo dos fatores associados à cárie dentária em crianças que recebem atenção odontológica precoce: odontologia para bebês.** São Paulo, 1998. 108p. Tese (Doutorado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

FRANSEN, E. V.; PEDRAZZOLI, V.; KILIAN, M. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.6, n.3, p.129-133. jun 1991.

FUJIWARA, T.; TERAOKA, Y.; HOSHINO, T.; KAWABATA, S.; OOSHIMA, T.; SOBUE, S.; KIMURA, S.; HAMADA, S. Molecular analyses of glucosyltransferase genes among strains of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.161, n.2, p.331-336, 1998.

FUJIWARA, T. ; HOSHINO, T.; OOSHIMA, T.; HAMADA, S. Differential and quantitative analyses of mRNA expression of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* Mt8148. **J. Dent. Res.**, v.81, n.2, p.109-113, 2002.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L.(Eds.) **Ecolog. Microb.** Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, Cap.8, p.205-227, 1998.

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n 14, p.12-16, 2000.

GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Carbohydrates and cell surfaces. In: **Biochem.** Florida: saunders college Publishing, v.1, p.311-350, 1995.

GIBBONS, R. J. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. **J. Dent Res**, v.63, p.378-385, 1984.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A. Selective medium for *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral Biol.**, v.18, p.1357-1364, 1973.

GOLDMAN, N. Phylogenetic estimation. In: BISHOP, M.J.; RAWLINGS, C.J.(Eds.) **DNA and protein sequence analysis – a practical approach.** New York: IRL Press, 1997, p.279-312.

GONÇALVES, R. B.; ROSA, R. T.; STIPP, R. N.; NAPIMOGA, M. H.; ROSA, E. A. R.; HÖFLING, J. F. Genetic diversity and cariogenic potential of *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res.**; p.281-286, 2002.

GRINDEFJØR, M.; DAHLLÖF, G.; WIKNER, S.; HOJER, B.; MODÉER, T. Prevalence of mutans streptococci in one-year-old children. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.6, n.5, p.280-283, Oct. 1991.

GRINDEFJOR, M.; DAHLLÖF, G.; NILSSON, B.; MODÉER, T. Stepwise prediction of dental caries in children up to 3,5 years of age. **Caries Res.**, v.30, n.4, p.256-266, July/Aug. 1996.

GRONROOS, L.; ALALUSUA, S. Site-specific oral colonization of *mutans* streptococci detected by arbitrarily primed PCR finger printing. **Caries Res.**, v.34, n.6, p.474-480, Nov.-Dec., 2000.

HAJISHENGALLIS, G.; MICHALEK, S. M. Current status of a mucosal vaccine against dental caries, **Oral Microbiol. Immunol.**, v.14,n.1, p. 1-20, Feb. 1999.

HALL, T.A. BioEdit 4.8. Raleigh,. 1 arquivo (11,5M); Disponível em <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>> BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. Acess July 2006, 1997-2001.

HAMADA S. Overview of the biology of streptococcus mutans. In: **Molecular microbiology and immunobiology of Streptococcus mutans**. Hamda S, Michalek S, Kiyono H, Menaker L, McGhee J, eds. Elsevier Science Publishing Inc.: New York; p.7-20, 1986.

HANADA, N.; KURAMITSU, H. Isolation and characterization of the streptococcus mutans gtfC gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. **Infect. Immune**, v.56, n.8, p.1999-2005, Aug., 1988.

HANADA, N.; YAMASHITA, Y.; SHIBATA, Y.; SATO, S.; KATAYAMA, T.; TAKEHARA, T.; INOUE, M. Cloning of a *Streptococcus sobrinus* gtf gene that encodes a glucosyltransferase which produces a high-molecular-weight water-soluble glucan. **Infect. immune**, v.59, n.10, p.3434-3438, Oct. 1991.

HANNULA, J. **Clonal types of oral yeasts in relation to age, health and geography**. Helsinki, 2000. Academic Dissertation. Faculty of Medicine of the University of Helsinki.

HAUSEN, H. Caries prediction – state of the art. **Commun. Dent. Oral Epidemiol**, v.25, n 1, p. 87-86, feb. 1997.

HAZLETT, K. R. O.; MICHALEK, S. M.; BANAS, J. A. Inactivation of the gbpA gene of *Streptococcus mutans* increases virulence and promotes in vivo accumulation of recombinations between the glucosyltransferase B and C genes. **Infect. Immun.**, v.66, n.5, p.2180-2185, May 1998.

HAZLETT, K. R. O.; MAZURKIEWICZ, J. E.; BANAS, J. A. Inactivation of the gbpA gene of *Streptococcus mutans* alters structural and functional aspects of plaque biofilm which compensated by recombination of the gtfB and gtfC genes. **Infect. Immun.**, v.67,n.8, p.3909-3914, Aug. 1999.

HERSHKOVITZ, M.A.; LEIPE, D.D. Phylogenetic analysis. In: BAXEEVANIS, A.D.; QUELLETTE, B.F.F.(Eds). **Bioinformatics – a practical guide to the analysis of genes and proteins**. New York: John Wiley e Sons, 1998, p.189-230.

HIGGINS, D.; THOMPSON, J.; GIBSON, T.; THOMPSON, J.D.; HIGGIN S.D.G.; GIBSON, T.J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Acid. Res.**, n. 22, p.4673-4680, 1994.

HIROSE H.; HIROSE K.; ISOGAI, E.; MIURA, H.; UEDA, I. Close association between streptococcus sobrinus in the saliva of young children and smooth-surface caries increment. **Caries Res.**, v.27, n.4, p.292-297, 1993.

HOMER, K. A.; WHILEY, R. A.; BEIGHTON, D. Proteolytic activity of oral streptococci. **FEMS Microbiology Letters**, v.55, p.257-260, 1990.

HONDA, O.; KATI, C.; KURAMITSU, H. K. Nucleotide sequence of the *Streptococcus mutans* gtfD gene encoding the glucosyltransferase-S enzyme. **J. Gen. Microbiol.**, v.136, n. Pt10, p.2099-2105, Oct. 1990.

HUANG X.; LIU, T.; CHEN, G. Typing of *Streptococcus mutans* (serotype C) by arbitrarily primed polymerase reaction. **Zhonghua Kou Qiangy Yi Xue ZA Zhi**, Jul., v.36, n.4, p.281-284, 2001.

IGARASHI, T.; ICHIKAWA, K.; YAMAMOTO, A., GOTO, N. Identification of *mutans* streptococcal species by the PCR products of the dex genes. **J. Microbiol. Methods**, Aug., v.46, n.2, p.99-105, 2001.

JACKSON RJ, LIM DV e Dao ML, Identification and analysis of a collagenolytic activity in *Streptococcus mutans*, **Curr. Microbiol.**, v.34, p. 49–54, 1997.

JERMANN, R.M.; OPITZ, J.G.; STACKHOUSE, J.; BENNER, S.A. Reconstructing the evolutionary history of the artiodactyls ribonuclease superfamily. **Nat.**, London, v.374, p.57-59, 1995.

JORGE, A. O. C. **Microbiologia Bucal**, 2ª ed. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1998. 121p.

KAMIYA, R. U. **Análise genotípica e mutacinotipagem de streptococcus mutans isolados de indivíduos cárie-ativos e livres de cáries**. Tese de Mestrado, Piracicaba> UNICAMP/FOP; 2003.

KATO, C.; KURAMITSU, H. K. Carboxyl-terminal deletion analysis of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase I enzyme. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.60, n.3, p.299-302, Nov. 1990.

KATZ, S. Diet counseling program. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.102, n.6, p.840-845, 1981.

KLEIN, M. I., FLÓRIO 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.10, p. 4620-4626, October, 2004.

- KOGA, C. Y.; UNTERKIRCHER, C. S.; FANTINATO, V.; SHIMIZU, M. T.; JORGE, A. O. C. Testes de atividade de cárie. Avaliação de diferentes métodos. **Preventiva**, v.43, n.3, p.141-144, 1995.
- KÖHLER, B.; BRATTHALL, D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. **J. Clin. Microbiol.**, v. 9, n. 5, p. 584-588, May 1979.
- KÖHLER, B.; KRASSE, B. Human strains of mutans streptococci show different cariogenic potential in the hamster model. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.5, n.4, p.177-180, Aug. 1990.
- KÖHLER, B.; BIRKHED, D.; OLSSON, S. Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, **Caries Res.**, v.29, n.5, p.402-406, 1995.
- KOLENBRANDER, P. E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **J. Bact.**, v.175, n.11, p. 3247-3252, 1993.
- KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions and genetic systems. **Annual Rev. Microbiol.**, v.54, p.413-437, 2000.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W.C. **Diagnostic Microbiology**, 5^a ed. MEDSI-Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro-RJ, 2001. 1465p.
- KREULEN, C. M.; DE SOET, H. J.; HOGVEEN, R.; WEERKAMP, J. S. *Streptococcus mutans* in children using nursing bottles. **ASDC J. Dent. Child.**, v.64, p.107-11, 1997.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v.5, n.2, p.150-163, 2004.
- LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M.R.; CHARNAY, M.P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S.I.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR - restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.2029-2036, 1996.
- LANE, D.L.; PACE, B.; OLSEN, G.J.; STAHL, D.A.; SOGIN, M.L.; PACE, N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of National Academy of Science**, v.82, p.6955-6959, 1985.
- LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F.; KITAJIMA, E. W.; ISHIDA, M. L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.9, p.1-41, 2001.
- LI, Y.; CAUFIELD, P. W. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. **J. Dent. Res.**, v.74, p.681-685, 1995.

- LI, Y.; CAUFIELD, P. W. Arbitrarily primed polymerase chain reaction finger printing for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.13, p.17-22, 1998.
- LI, Y.; CAUFIELD, P. W.; EMANUELSSON, I. R.; THORNQVIST, E. Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.16, n.1, p.16-23, Feb. 2001.
- LINDQUIST, B. **Mutans streptococci in human dentition.** Thesis, Göteborg: University of Göteborg, 1991.
- LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol. Rev.**, v.50, n.4, p. 353-380, Dec.1986.
- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v.15, p.155-173, 1994.
- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogeny of bacterial beyond the 16 S r RNA standart. *ASM News*, Washington, v.65, n.11, p.752-757, 1999.
- MALTZ, M.; ZICKERT, I. Effect of penicillin on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and lactobacilli in hamsters and in man. **Scand. J. Dent. Res.**, v.90, p.93-199, 1982.
- MARCHANT, S.; BRAILSFORD, S. R.; TWOMEY, A. C.; ROBERTS G.R.; BEIGTON, D. The predominant microflora of nursing caries lesions. **Caries Res.**, v.35, n.6, p.397-406, Nov.-Dec. 2001.
- MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary imunoglobulin A. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.71-109, 1998.
- MATEE, M. I. N.; MIKX, F. H. M.; DE SOET, J. S.; MASELLE, S. Y.; DE GRAFF, J.; VAN PALENSTEIN HELDERMAN, W. H. Mutans streptococci in caries-active and caries-free infants in Tanzania. **Oral Microbial Immunol.**, v.8, n.5, p.322-324, Oct. 1993.
- MATTOS-GRANER, R. O. **Relação entre os níveis bucais de estreptococos do grupo mutans, alguns de seus fatores de virulência e a incidência de cárie dental em crianças de 12 a 30 meses de idade.** São Paulo, 1999, tese de doutorado, Universidade de São Paulo.
- MATTOS-GRANER, R. O.; SMITH, D. J., KING, W. F., MAYER, M. P. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12 to 30 months-old children. **J. Dent. Res.**, v.79, p.1371-1377, 2000.
- MATTOS-GRANER, R. O.; JIN, S., KING, W. F., CHEN, T., SMITH, D. J., DUNCAN, M. S. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene end coding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. **Infect. Immun.**, v.69, p.6931-6941, 2001.

MAYER, R. P. A.; BUENO, L.C.; HASEN, E. J.; DIRIENZO, J. M. Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *actinobacillus actinomtacetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v.67, n.3, p.1227-1237, Mar. 1999.

MEGNEGNEAU, P.; DEBETS, F.; HOCKSTRA, R. F. Genetic variability and relatedness in the complex group of black Aspergilli based on random amplification of polymorphic DNA. **Current Genet.**, Berlin, v. 23, p.323-329, 1993.

MOBLEY C.C. Nutrition and Dental caries. **Dent. Clin. N. Am.**; v.47, n.2, p.319-336, 2003.

MONTANARO, L.; CAMPOCCIA, D.; RIZZI, S.; DONATI, M. E.; BRESCHI, L.; PRATI, C.; ARCIOLA, C. R. Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. **Biomaterials**, v.25, p.4457-4463, 2004.

MOREIRA, M. **Variabilidade genética de *Streptococcus mutans* em isolados intrafamiliares, por meio de marcadores RAPD.** Curitiba, 2006. 80p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. A polymerase catalyzed chain reaction. In: WU, R (Eds). **Recombinant DNA** – Part F. San Diego: Academic Press, 1987, p. 335-350.

MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Sci. Am.**, p.56-65, 1990.

MUNRO, C.; MICHALEK, S. M.; MACRINA, F. L. Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutants constructed by allelic exchange. **Infect. Immun.**, v.59, n.7, p.2316-2323, July 1991.

MURPHY, K.M., BERG, K.D.; EHLEMAN, J.R. Sequencing of Genomic DNA by Combined Amplification and Cycle Sequencing reaction. **Clin. Chem.**, v.51, n.1, p.35-39, 2005.

MUSSER, J. M.; KROLL, J. S.; MOXON, E. R.; SELANDER, R. K. Clonal population structure of encapsulated haemophilus influenzae. **Infect. Immun.**, v.56, n.8, p.1837-1845, Aug., 1988.

NAPIMOGA, M. H. *et al.* Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries active individuals. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.697-703, 2004.

NAPIMOGA, M. H.; HOFLING, J. F.; KLEIN, M. I.; KAMIYA, R. U.; GONÇALVES, R. B. Transmission diversity and virulence factors of *Streptococcus* genotypes. **Jornal Oral Science**, v.47, n.2, p.59-64, 2005

NEI, M.; TAKEZAKI, N.; SITNIKOVA, T. Assessing molecular phylogenies. **Sci.**, Washington, v. 267, p.253-255, 1995.

NEI, M. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. **Annu. Rev. Gen.**, Palo Alto, v.30, p.371-403, 1996.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Rev. Microbiol.**, v.54, p.49-79, 2000.

OHO, T.; YAMASHITA, Y.; SHIMAZAKI, Y. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. **Oral Microbiol. Immunol.**, Aug., v.15, n.4, p.258-262, 2000.

OKADA, M.; SODA, Y.; HAYASHI, F. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. **J. Med. Microbiol.**, May, v.51, n.5, p.443-447, 2002.

OOSHIMA, T.; MATSUMURA, M.; HOSHIMO, T.; KAWABATA, S. e FUJIWARA, T. Contributions of three glycosyltransferase to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res.**, v.180, p.1672-1677, 2001.

O'SULLIVAN, D.M.; THIBODEAU, E.A. Caries experience and mutans streptococci as indicators of caries incidence. **Pediatr. Dent.**, v.18, n.5, p. 371-374, sep/Oct. 1996.

PADDICK JS; BRAILSFORD SR; KIDD EA; GILBERT SC; CLARK DT; ALAM S; KILLICK ZI; BEIGHTON D. Effect of the environment on genotypic diversity of *Actinomyces Naeslundii* and streptococci oral in the biofilm. **Appl. Environ. Microbiol.**, n.69, p.6475-6480, 2003.

PENNY, D. From Macromolecules to trees. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Eds). **Nucleic Acid Tech. Bact. System**. New York: John Wiley e Sons. Ltd, 1991, p.281-324.

PEREIRA, M. S. V.; LEAL, N. C.; LEAL, T. C. A.; SOBREIRA, M.; ALMEIDA, M. P.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD and ribotyping-PCR. **Lett. in Appl. Microbiol.**, n.35, p. 32-36, 2002.

PETTI, S.; HAUSEN, H. W. Caries prediction by multiple salivary mutans streptococcal counts in caries-free children with different levels of fluoride exposure, oral hygiene and sucrose intake, **Caries Res.**, v.34, p.380-387. 2000.

REDMO-EMANUELSSON, I. M.; CARLSSON, P.; HAMBERG, K.; BRATTHAL, D. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.18, p.24-29, 2003.

REIS JUNIOR, F.B.; REIS, V.M; TEIXEIRA, K.R.S. Restrição do 16S- 23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.41, n.3, p.431-438, 2006.

RIPA, L.W. Nursing caries: a comprehensive review. **Pediatr. Dent.**, v. 10, n. 4, p. 268-282, Dec. 1988.

ROHLF, F.J. **NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system – version 2.1** New York, Applied Biostatistic Inc., 44p., 1988.

RUSSEL, R. R. B. Glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* Strain Ingbritt. **Microbios.**, v.23, n.4, p.135-146, May 1979.

RUSSEL, M. W.; HAJISHENGALLIS, G.; CHILDERS, N. K.; MICHALEK, S. M. Secretary immunity in defense against cariogenic mutans streptococci. **Caries Res.**, v.33, n.1, p.4-15, Jan/Feb. 1999.

SAARELA, M.; VON TROIL-LINDEN, B.; TORKKO, H.; STUCKI, A. M; ALALUUSUA, S.; JOUSIMIES-SOMER, H.; ASIKAINEN, S. Transmission of oral bacteria species between spouses. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.8, p.349-354,1993.

SAARELA, M.; HANNULA, J.; MATTO, J.; ASIKAINEN, S.; ALALUUSUA, S. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Arch. Oral Biol.**, v.41, p.821-826, 1996.

SAIKI, R. K.; SCARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Sci.**, Washington, v.23, p.1350-1354,1985.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Sci.**, Washigton, v.239, p.487-491, 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. New York: **Cold Spring Harbor Lab. Press**, 2002.

SANKOFF,D. Minimal mutayion tress of sequences. **SIAM. J. Appl. Math.**, v.28,n.1, p. 35-42-1975.

SCHLOTTER, M.; LEBUHN, M.; HEULIN, T.; HARTMANN, A. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.647-660, 2000.

SCHNEIDER, S; ROESSLI, D; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2000**: A software for population genetics data analysis. Switzerland: genetic and Biometry Laboratory/ University of Geneva.

SCHULMAN, J.S. Nutrition and dental health of children. In: Forrester, D.J.; Wagner, M.L.; Fleming, J. **Pediatric Dental Medicine**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1991.

SHIROZA, T.; UEDA, S.; KURAMITSU, H. K. Sequence analysis of the gtfB gene from *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol**, v.169, n.9, p.4263-4270, Sept. 1987.

SMITH , D. J.; TAUBMAN, M. A. Oral immunization of humans with *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferade. **Infect. Immun.**, v.55, n.11, p.2562-2569, Nov. 1987.

SMITH , D. J.; TAUBMAN, M. A; EBERSOLE, J. L. Effects of local immunization with glucosyltransferase on colonization of hamsters by *Streptococcus mutans*. **Infect. Immun.**, v.37, n.2, p.656-661,aug. 1992.

SMITH , D. J.; ANDERSON, J. M.; KING, W. F.; VAN HOUTE, J.; TAUBMAN, M. A. Oral streptococcal colonization of infants. **Oral Microbiol Immunol.**, v.8, n.1, p.1-4, Feb. 1993.

SMITH , D. J.; TAUBMAN, M. A; KING, W. F.; EIDA, S.; POWELL, JR.; EASTCOTT, J. W. Immunological characteristics of a synthetic peptide associated with a catalytic domain of mutans streptococcal glucosyltransferase. **Infect. Immun.**, v.62, n.6, p.5470-5476, June 1994.

SMITH , D. J.; SHOUSHARI, 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.**, v.65, n.11, p.4424-4430, Nov 1997.

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.**, v.13, n.5, p.278-285, Oct., 1998.

SNEAT, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**, San Francisco: W.F. Freeman, San Francisco, USA, 1973.

STADEN, R, JUDGE D P.; BONFIELD, J.K. Sequence assembly and finishing methods. **Methods Biochem. Analys.**, v.43, p.303-322, 2001.

SWOFFORD, D.L.; OLSEN, G.J.; WADDELL, P.J.; HILLIS, D.M. Phylogenetic inference. In: HILLIS D.M; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (Eds). **Molecular Systematics**. Sanderland: Sinauer Associates, p.407-514, 1996.

TAKAHATA, N. Allelic genealogy and human evolution. **Mol. Biol. Evol.**, Lawrence, v.10, p. 2-22, 1993.

TANZER, J. M. Microbiology of dental caries. In: SLOTS, J.; TAUBMAN, M.A. **Contemporary Oral Microbiology an Immunology**, St. Louis: Mosby Year Book, p.377-424, 1992.

TAUBMAN, M.A.; HOLMBERG, C.J.; SMITH, D.J. Immunization of rats with synthetic peptide constructs from glucan-binding or catalytic region of mutans streptococcal glucosyltransferase protects against dental caries. **Infect Immun**, v.63, n.8, p.3388-3093, Aug. 1995.

TENOVUO, J. Antimicrobial function of human saliva-how important is it oral health? **Acta Odonto. Scand.**, v.56, p.250-256, 1998.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weigh matrix choice. **Nucleic Acid Res.**, v.22, p.4673-4680, 1994.

TRAHAN L., MOUTON C. Selection for streptococcus mutans with na Altered Xylitol transport capacity in chonic xylitol consumers, **J. Dent. Res.**, V.66, n.5; p.982-988, 1987.

THEILADE E, BIRKHED D. Dieta e cárie. In: Thylstrup A, Fejerskov O, editors. **Tratado de Cariologia**. Rio de Janeiro: Cultura Médica; p. 117-54, 1988.

TRUONG, T.L.; MENARD, C.; MONTON, C. Identification of *mutans* and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. **J. Med. Microbiol.**, v.49, n.1, p.63-71, 2000.

TSUMORI, H.; KURAMITSU, H. The role of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases in the sucrose-dependent attachment to smooth surfaces: essential role of the Gtf C enzyme. **Oral Microb. Immun.**, v.12, n.2, p. 274-280, Mar. 1997.

VAN DE PEER, Y.; CHAPELLE, S.; DE WACHER, R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. **Nucl. Acid. Res.**, Oxford, v.24, n.17, p.3381-3391, 1996.

VAN HOUTE, J.; LOPMAN, J.; KENT, R. The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and surfaces. **J. Dent. Res.**, v.75, n.4, p.11008-1014, 1996.

VICENTE, V. A. Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose. Piracicaba, SP. 2000. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 172p.

VICKERMAN, M.M.; JONES, G.W. Sucrose-dependent accumulation of oral streptococci and their adhesion-defective *mutans* on saliva-coated hydroxyapatite. **Oral Microb. Immun.**, v.10, n.3, p.175-182, 1995.

WAN, A.K.L.; SEOW, W.K.; PURDIE, D.M.; BIRD, P.S.; WALSH, L.J.; TUDEHOPE, D.I. A longitudinal study of *Streptococcus mutans* colonization in infants after tooth eruption. **J. Dent. Res.**, v.82, n.7, p. 504-508, 2003.

WANG, G.; WHITTAM, T. S.; BERG, C. M.; BERG, D. E. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. **Nucl. Acids. Res.**, Oxford, v.21, p.5930-5933, 1993.

WATSON, J. D.; GILMAN, M.; WITKOSWIKI, J.; ZOLLER, M. **Recombinant DNA**. 2 ed. New York: Freeman and Company. 1992.

WELSH, J. e McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucl. Acids Res.** V.18, p.7213-7218, 1990.

WELSH, J. e McCLELLAND, M. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. **Nucl. Acids Res.**, v.19, p.5275-5279, 1991.

WENNERHOLM, K.; BIRKED, D.; EMILSON, C.G. Effects of sugar restriction on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva and dental plaque. **Caries Res.**, v.29, n.1, p.54-61, Jan/Feb. 1995.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.**, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALKI, J. A.; TINGEY, S. V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Meth. Enzym.**, San Diego, v.218, p.704-740, 1993.

WILSON, A.C.; CARLSON, S.S.; WHITE, T.J. Biochemical evolution. **Annun. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v.46, p.573-639, 1977.

YAMASHITA, Y.; BOWEN, W. H.; KURAMITSU, H. K. Molecular analysis of a *Streptococcus mutans* strain exhibiting polymorphism in the tandem *gtfB* and *gtfC* genes. **Infect. Immun.**, v.60, n.4, p.1618-1620, Apr.1992.

YAMASHITA, Y.; BOWEN, W. H.; BURNE, R. A.;KURAMITSU, H. K. Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. **Infect. Immun.**, v.61,n.9, p.3811-3817, Sept 1993.

YANG, W. M.; YNOUYE, C. J.; ZENG, Y.; BEARSS, D.; SETO, E. Transcriptional repression by YY *lis* mediated by interaction with mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v.93, p.12845-12850, 1996.

YAZAKI, S. C.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A. O. C.; UNTERKIRCHER, C.S. IgA anti-streptococcus mutans em crianças com e sem cárie dentária. **Rev. Odontol. Univ. S. P.**, v. 3, n.3, p.211-217, 1999.

YONG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (Eds). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman e Hall, p.43-86, 1992.

ZUCKERKANDL, E., PAULING, L. Molecular as documents of evolutionary history. **J. Theor Biol**, v.8, n.2, p.357-366, 1965.

ZICKERT, I., EMILSON.CG., KRASSE,B. Effect of caries preventive measure in children highly infected with the bacterium *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral Biol.**, v.27, p.861-868, 1982.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - AVALIAÇÃO DA DIETA E COLONIZAÇÃO SALIVAR DE *S. mutans* EM CRIANÇAS COM DIFERENTES HISTÓRICOS DA DOENÇA CÁRIE

Fatores	Nº	Criança	Idade	Morfologia <i>S. mutans</i>	Diluição	CPOD	ceo	Biofilme	Cárie ativa
>aç	01	A	3	Pe+q	0,00	0	4	++	Sim
>UFC	02	B	3	punti	1/100	0	5	++	Sim
>CA	03	C	8	peq	1/30	0	6	++	Sim
Grupo I	04	D	4	punti	1/30	0	6	++	Sim
	05	E	12	méd	1/20	4	--	++	Sim
	06	F	8	peq	1/5	0	2	++	Não
	07	G	4	méd	1/30	0	5	++	sim
	08	H1	11	punti	1/50	12	--	++	Sim
	09	H2	11	méd	1/50	12	--	++	Sim
	10	I	4	méd	1/10	0	4	++	Sim
	11	J1	7	gr	1/50	0	5	++	Sim
	12	J2	7	méd	1/50	0	5	++	sim
	13	J3	7	peq	1/10	0	5	++	Sim
	14	K1	6	punti	1/50	4	5	++	Sim
	15	K2	6	méd	1/50	4	5	++	Sim
	16	L1	10	méd	1/50	1	7	++	Sim
	17	L2	10	punti	1/50	1	7	++	Sim
	18	M	7	punti	1/150	1	4	++	Sim
>aç	19	N	6	punti	0,00	2	4	+++	Não
<UFC	20	O1	11	peq	1/50	4	--	+++	Sim
>CA	21	O2	11	punti	1/30	4	--	+++	Sim
Grupo II	22	P	8	punti	1/100	0	2	+++	Não
	23	Q	4	punti	0,00	0	4	+++	Sim
	24	R	4	méd	1/20	0	5	+++	Sim
	25	S1	4	punti	1/100	0	6	++	Sim
	26	S2	4	méd	1/100	0	6	++	Sim
	27	T	4	gr	1/5	0	2	++	Sim
	28	U	7	punti	1/5	2	3	+++	Sim
	<aç	29	V1	10	punti	1/30	0	--	+
<UFC	30	V2	10	méd	1/50	0	--	+	Não
<CA	31	W1	3	méd	1/50	--	0	++	Não
Grupo III	32	W2	3	peq	1/30	--	0	++	Não
	33	X1	5	méd	1/10	--	0	+	Não
	34	X2	5	peq	0,00	--	0	+	Não
	35	X3	5	gr	0,00	--	0	+	Não
	36	Y1	4	méd	1/30	--	0	+	Não
	37	Y2	4	gr	1/100	--	0	+	Não
	38	Z	11	punti	1/30	0	--	+	Não
	39	α	12	peq	1/50	0	--	+	Não
	40	&	9	peq	1/100	0	1	+	Não
	41	&	9	gr	1/200	0	1	+	Não
	42	€	7	punti	1/100	0	1	+	Não
	43	€	7	peq	1/70	0	1	+	Não
	44	¥	11	peq	1/30	2	--	++	Não

Legenda: + pouco biofilme dental, ++ muito biofilme dental, +++ presença de cálculo dentário; -- não se aplica; 0 á 1000 UFC (<UFC) e acima de 10000 UFC (>UFC); A a ¥ corresponde a diferentes crianças analisadas, > ou < aç = maior ou menor quantidade de açúcar na dieta; > ou < CA = maior ou menor histórico da doença cárie

APÊNDICE 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos realizando uma pesquisa cujas amostras serão selecionadas em alunos de escolas municipais de Campo Largo e região metropolitana; vinculadas ao projeto de extensão do Departamento de Patologia básica na disciplina de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná; o objetivo desta pesquisa é estudar o isolamento e caracterização molecular de *Streptococcus mutans* em crianças com diferentes atividades de cárie para se possível confeccionarmos um *oligonucleotídeo iniciador* de diagnóstico.

Não existem riscos ao paciente relacionados a esta pesquisa, que consiste apenas em coleta de saliva. Não será realizado nenhum procedimento clínico em seu filho (a) relacionado a esta pesquisa.

O dentista responsável pela pesquisa, Ivana Froede Neiva poderá ser encontrada nos telefones 0xx41 3360-4052. Caso seja mais conveniente a professora Vânia Aparecida Vicente está autorizada, como pesquisadora e orientadora deste trabalho, a prestar os esclarecimentos e pode ser encontrada no Departamento de Patologia Básica, na Disciplina de Microbiologia da universidade Federal do Paraná.

Estão garantidas todas as informações que você queira, antes e depois do estudo. A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de não autorizar sua participação no estudo, ou se aceitar, retirar seu consentimento a qualquer momento. O tratamento executado na UFPR não está condicionado a sua participação.

Os resultados serão divulgados em relatório, eventos e/ou publicações científicas, sendo isto feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

Nenhuma despesa necessária para a realização da pesquisa será de sua responsabilidade. Para sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado (a) a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper a participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão. Eu concordo e autorizo meu (s) filhos voluntariamente a participar deste estudo.

_____ Data __ / __ / __ Assinatura do responsável

_____ Data __ / __ / __ Ivana Froede Neiva

APÊNDICE 3 - FICHA DE ANAMNESE E EXAME CLÍNICO

Questionário de Anamnese:

1. Nome da criança: 2. Número do prontuário
3. Data de nascimento 4. Data do exame:
5. Nome da mãe ou responsável:
6. Está fazendo ou fez uso de algum medicamento na última semana? Qual?
7. Fez uso de algum enxaguatório bucal na última semana? Qual?

Presença de Placa

52/12	51/11	61/21	62/22
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
82/42	81/41	71/31	72/32

Códigos

- 0 - Ausência de placa evidente
- 1 - Presença de placa evidente

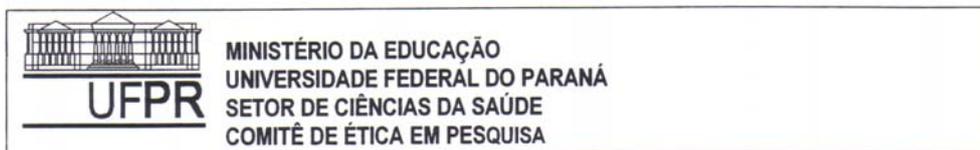
Odontograma

<input type="checkbox"/>															
<input type="checkbox"/>															
<input type="checkbox"/>															
<input type="checkbox"/>															

Códigos

- 0 - dente ausente
- 1 - dente presente
- 2 - dente com lesão de cárie (restaurado ou não)
- 3 - dente restaurado (sem lesão de cárie)

APÊNDICE 4 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Curitiba, 08 de julho de 2.004.

Ilmo (a) Sr. (a)
Ivana Froede Neiva
Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BISSOROTIPOS DE STREPTOCOCCUS MUTANS PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO ODONTOLÓGICO", está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR em reunião do dia 07 de julho de 2.004.
Registro **CEP/SD**: 085.SI 048/04-06

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente


Prof. Dr. Miguel Ibrahim A. Hanna Sobrinho
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Endereço: Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-Pr. – C EP: 80060-240

APÊNDICE 5 - ACEITE DE TRABALHOS

Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes

DECLARAÇÃO DE ACEITE DE TRABALHO

Declaramos, para todos os fins que se fizerem necessários e de direito, que recebemos os seguintes trabalhos para publicação na Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Centro Tecnológico da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, intitulados:

1) Isolamento, identificação e extração de DNA Genômico de *Staphylococcus aureus* de mastites clínicas e subclínicas bovina, pelo método do CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio).

Autores: Gonçalves, D.; Higuti, I. H.; Vicente, V. A.; Bittencourt, J. V. M, **Neiva, I. F**, Andersen, E. e Gonçalves, C. H. M.

2) Análise molecular por meio de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) em populações de *Staphylococcus aureus*, causadoras de infecções intramamárias em bovinos.

Autores: Gonçalves, D.; Vicente, V. A.2; Higuti, I. H.; Bittencourt, J.V.M, **Neiva, I. F**, Pie, M; Andersen, E. e Gonçalves, C. H. M.

Os referidos trabalhos, encaminhado para análise pela Comissão Editorial da Revistado ILCT foram aprovados, e serão enviado para fase de editoração, com data de publicação prevista para o número 353 , referente aos meses de novembro/dezembro de 2006 - Volume 61, podendo ainda haver uma ou outra mudança em relação aos números da Revista do ILCT.

Juiz de Fora, 29 de Agosto de 2006

Luiza Carvalhaes Albuquerque

Editora Responsável - Revista do I.L.C.T.

Coordenadora de Transferência e Difusão de Tecnologia do CT/ILCT

APÊNDICE 6 - TRABALHO PARA FUTURA PUBLICAÇÃO

Polimorfismo genético de diferentes biosorotipos de *Streptococcus mutans* isolados de crianças de baixa renda

Autores: Neiva, I. F¹; Moreira, M²; Vicente, V. A³; Gonçalves, D⁴; Carvalho, Y⁵.

1 . Doutoranda em Processos Biotecnológico e Professora do Departamento de Odontologia Restauradora – UFPR; 2 Mestre em Microbiologia e Cirurgiã Dentista da Prefeitura de Curitiba; 3. Professora Dr^a do Departamento de Patologia Básica da UFPR; 4 . Doutor em Bioprocessos e Médico Veterinário; 5. Doutora em Agronomia

ABSTRACT

Samples proceeding from saliva of low income children, with different activities and experiences of tooth decays and saccharose intake had been isolated and classified from *mutans* group. 44 samples were characterized using morphological and biochemical identification after sowed in a *Mitis Salivarius Agar*. Additionally, the Gram coloration test was used to isolation of the positive samples in mean containing 20% of glycerol and frozen to 80°C. *Streptococcus mutans* genomic DNA was extracted by method of CTAB, associated sonication and other different chemical composites in buffer. The RAPD reaction used the OPA2, OPA3 OPA5, OPA8, OPA9 and OPA13 oligonucleotide primers. The software “NTSYS” was used for polymorphism analisys using the Jaccard coefficient and the “UPGMA” method for construction of dendrograms. The consistency of different groupings was evaluated by boodstrap using the “winboot” software. The data showed great variability between the different sorotypes, detected by RAPD markers, considering their origin and the clinical data in different children group, with no association between genotype, tooth decay and saccharose intake.

Keywords: *Streptococcus mutans*; Children; Caries; RAPD.

RESUMO

Amostras de *Streptococcus mutans* provenientes da saliva de crianças de baixa renda, com diferentes atividades e experiências de cárie foram isoladas e classificadas a partir do grupo mutans. 44 amostras foram caracterizadas usando identificação morfológica e bioquímica após serem semeadas em *Agar Mitis Salivarius*. Adicionalmente, realizou-se o teste da coloração de Gram, isolando-se as amostras Gram positivas em meio líquido contendo glicerol a 20% e congelados em freezer - 80°C. O DNA genômico dos *Streptococcus mutans* foi extraído, pelo método do CTAB, associado a sonicação e outros diferentes compostos químicos no tampão. Para reação de RAPD utilizou-se os oligonucleotídeo iniciadores iniciadores OPA2, OPA3, OPA5, OPA8, OPA9 E OPA13. O software “NTSYS” foi utilizado para análise do polimorfismo usando o coeficiente de Jaccard e o método “UPGMA” para construção de dendrogramas. A consistência dos agrupamentos foi avaliada por *boodstrap* usando o “winboot” software. Os dados revelaram grande variabilidade detectada por marcadores RAPD, considerando-se sua procedência e dados clínicos em diferentes grupos de crianças, sem associação entre genótipo, cárie dental e consumo de sacarose.

Palavras -Chave: *Streptococos mutans*; Criança; Cárie; RAPD.

ANEXOS

ANEXO 1 – SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DO GENE *gtf-B* DOS ISOLADOS ANALISADOS

```
[
[      111 111 111 122 222 222 223 333 333 333 444 444 444 455 555 555 556 ]
[      123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 ]
#1     GGT GGC TTG GTT AAA GCA GAT TCT AAT GAA TCG AAA TCC CAA ATT TCT AAT GAT TCT AAT
#2     ... ..
#6     ... ..
#12    ... ..
#18    ... ..
#19    ... ..
#20    ... ..
#37    ... ..
#ATCC  ... ..
```

```
[
[      666 666 666 777 777 777 788 888 888 889 999 999 999 111 111 111 111 111 111 ]
[      123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 ]
#1     ACT AGT GTT GTT ACT GCT AAT GAA GAA TCT AAT GTA ACA ACC GAA GCG ACA TCT AAG CAA
#2     ... ..
#6     ... ..
#12    ... ..
#18    ... ..
#19    ... ..
#20    ... ..
#37    ... ..
#ATCC  ..C ... ..
```

```
[
[      111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 ]
[      222 222 222 333 333 333 344 444 444 445 555 555 555 666 666 666 677 777 777 778 ]
[      123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 ]
#1     GAA GCT GCT AGT AGT CAA ACT AAT CAT ACA GTA ACG ACA AGC AGT AGC TCT ACT TCG GTA
#2     ... ..
#6     ... ..
#12    ... ..
#18    ... ..
#19    ... ..
#20    ... ..
#37    ... ..
#ATCC  ... ..
```

```
[
[      111 111 111 111 111 111 122 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 ]
[      888 888 888 999 999 999 900 000 000 001 111 111 111 222 222 222 233 333 333 334 ]
[      123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 ]
#1     GTT AAT CCC AAA GAG GTT GTA AGT AAT CCT TAT ACT GTT GGG GAA ACA GCT TCT AAT GGT
#2     ... ..
#6     ... ..
#12    ... ..
#18    ... ..
#19    ... ..
#20    ... ..
#37    ... ..
#ATCC  ... ..
```

```
[
[      222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 223 ]
[      444 444 444 555 555 555 566 666 666 667 777 777 777 888 888 888 899 999 999 990 ]
[      123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 ]
#1     GAA AAG CTT CAA AAT CAA ACA ACT ACA GTT GAC AAA ACT TCT GAA GCT GCT GCT AAT AAT
#2     ... ..
#6     ... ..
#12    ... ..
#18    ... ..
#19    ... ..
#20    ... ..
#37    ... ..
#ATCC  ... ..
```


ANEXO 2 - PORCENTAGEM DE AMINOÁCIDOS PARA O GENE *gtf-B* DO *S. mutans* ANALISADO E DAS LINHAGENS DE REFERÊNCIAS PUBLICADAS NO "GENBANK"

Amostra	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu	Met	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr	Total	
Amostras analisadas	1	7.93	0.00	6.71	7.93	1.22	4.27	1.22	4.88	7.32	3.66	0.00	10.98	1.83	4.27	0.61	12.20	13.41	8.54	0.00	3.05	164
	2	7.93	0.00	6.71	7.93	1.22	4.27	1.22	4.27	7.32	4.27	0.00	10.37	1.83	4.27	0.61	12.80	13.41	8.54	0.00	3.05	164
	6	7.88	0.00	6.67	7.88	1.21	4.24	1.21	4.24	7.27	4.24	0.00	10.91	1.82	4.24	0.61	12.12	13.33	8.48	0.00	3.64	165
	12	7.93	0.00	6.71	7.93	1.22	4.27	1.22	4.88	7.32	3.66	0.00	10.98	1.83	4.27	0.61	12.20	13.41	8.54	0.00	3.05	164
	19	7.93	0.00	6.71	7.93	1.22	4.27	1.22	4.27	7.32	4.27	0.00	11.59	1.83	4.27	0.61	11.59	12.80	9.15	0.00	3.05	164
	37	7.32	0.00	6.71	7.93	1.22	4.27	1.22	4.27	7.32	4.27	0.00	11.59	1.83	4.27	0.61	11.59	13.41	9.15	0.00	3.05	164
	20	7.93	0.00	6.71	7.93	1.22	4.27	1.22	4.27	7.32	4.27	0.00	11.59	1.83	4.27	0.61	11.59	12.80	9.15	0.00	3.05	164
	18	7.32	0.00	6.71	7.93	1.22	4.27	1.22	4.27	7.32	4.27	0.00	11.59	1.83	4.27	0.61	11.59	13.41	9.15	0.00	3.05	164
	ATCC	7.93	0.00	6.71	7.93	1.22	4.27	1.22	4.27	7.32	4.27	0.00	10.98	1.83	4.27	0.61	12.20	13.41	8.54	0.00	3.05	164
Média	7.79	0.00	6.70	7.92	1.22	4.27	1.22	4.40	7.31	4.13	0.00	11.17	1.83	4.27	0.61	11.98	13.27	8.80	0.00	3.11	164.1	
GenBank	D89977	7.93	0.00	6.71	7.93	1.22	4.27	1.22	4.27	7.32	4.27	0.00	10.98	1.83	4.27	0.61	12.20	13.41	8.54	0.00	3.05	164
	D88660	7.93	0.00	6.71	7.93	1.83	4.27	1.22	4.27	6.71	4.27	0.00	11.59	2.44	3.66	0.61	11.59	13.41	8.54	0.00	3.05	164
	D88657	7.32	0.00	6.71	7.93	1.22	4.27	1.22	4.88	7.32	4.27	0.00	10.98	1.83	4.27	0.61	10.98	14.02	9.15	0.00	3.05	164
	D88654	7.93	0.00	6.71	7.93	1.22	4.27	1.22	4.27	7.32	4.27	0.00	10.98	1.83	4.27	0.61	12.20	13.41	8.54	0.00	3.05	164
	D886511	7.93	0.00	6.71	7.93	1.22	4.27	1.22	4.27	7.32	4.27	0.00	10.98	1.83	4.27	0.61	12.20	13.41	8.54	0.00	3.05	164
	Média	7.83	0.00	6.71	7.93	1.32	4.27	1.22	4.47	7.22	4.17	0.00	11.08	1.93	4.17	0.61	11.89	13.52	8.64	0.00	3.05	164
Média geral	7.79	0.00	6.70	7.92	1.26	4.27	1.22	4.40	7.27	4.18	0.00	11.14	1.87	4.22	0.61	11.93	13.37	8.75	0.00	3.09	164.1	

Legenda: Proximidade na porcentagem de aa para as amostras analisadas quando comparadas entre si e com as do "genbank"

ANEXO 3 – SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DA REGIÃO INTERGÊNICA DOS ISOLADOS ANALISADOS

```

[           111 111 111 122 222 222 223 333 333 333 444 444 444 455 555 555 556 ]
[ 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 ]
#1  TCC CGG GCC TTG TAC ACA CCG CCC GT- CAC ACC ACG AGA GTT TGT AAC ACC CGA A-G TCG
#2  ... ..-.
#6  ... ..-.
#12 ... ..-.
#18 ... ..-.
#20 ... ..-.
#37 ... ..-.
#sob ... ..G .G. ... ..A. .A. ...

```

```

[           111 111 111 111 111 111 111 ]
[ 666 666 666 777 777 777 788 888 888 889 999 999 999 000 000 000 011 111 111 112 ]
[ 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 ]
#1  GTG AGG TAA CCT TTT A-G GGG CCA GCC GCC TAA GGT GGG ATG GAT GAT TGG GGT GAA GTC
#2  ... ..-.
#6  ... ..-.
#12 ... ..-.
#18 ... ..-.
#20 ... ..-.
#37 ... ..-.
#sob ... ..A ... .T. ...

```

```

[ 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 ]
[ 222 222 222 333 333 333 344 444 444 445 555 555 555 666 666 666 677 777 777 778 ]
[ 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 ]
#1  GTA ACA AGG TAG CCG TAT CGG AAG GTG CGG CTG GAT CAC CTC CTT TCT AAG GAA AAA C--
#2  ... .. .-.
#6  ... .. .-.
#12 ... .. .-.
#18 ... .. .-.
#20 ... .. .-.
#37 ... .. .-.
#sob ... .. .T ... .TA

[ 111 111 111 111 111 111 122 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 ]
[ 888 888 888 999 999 999 900 000 000 001 111 111 111 222 222 222 233 333 333 334 ]
[ 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 ]
#1  -GC AAA GCA CAT TAG GGG AAC TTC TTG TTT AGT TTT GAG AGG GTA AGT GGG GCC TTA GCT
#2  -.. .. .-.
#6  -.. .. .-.
#12 -.. .. .-.
#18 -.. .. .-.
#20 -.. .. .-.
#37 -.. .. .-.
#sob A.T ..C .A. G.C GTT AA. ..A .C. G.A .GA .AA .AG .G. .C. .CC ..- AAA AT. C.G AT.

```

```
[ 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 223 ]
[ 444 444 444 555 555 555 566 666 666 667 777 777 777 888 888 888 899 999 999 990 ]
[ 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 ]
#1 CAG CTG GGA GAG CGC CTG CTT TGC ACG CAG GAG GTC AGC GGT TCG ATC CCG CT- --- ---
#2 ... ..- --- ---
#6 ... ..- --- ---
#12 ... ..- --- ---
#18 ... ..- --- ---
#20 ... ..- --- ---
#37 ... ..- --- ---
#sob TTC TA. .AC .GC .AT ..T T.. CCT .G. A.T TTA ... T.- A.. A.A ..T A.T TAG TAA CGG
```

```
[ 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 ]
[ 000 000 000 111 111 111 122 222 222 223 333 333 333 444 444 444 455 555 555 556 ]
[ 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 ]
#1 AGG CTC CAT TAA AAC AGG ATA CTA A-- --- CAG ACG GTT CGC TTG CGA ATA CTT CTG -TA
#2 ... ..- --- ---
#6 ... ..- --- ---
#12 ... ..- --- ---
#18 ... ..- --- ---
#20 ... ..- --- ---
#37 ... ..- --- ---
#sob .A. .A. GT. .TG GGG .C. C.. T.T .GT TTT ... .G. T.. T.T GG. GCC T.. GC. .A. C.G
```

```

[ 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 444 444 444 444 444 444 444 ]
[ 666 666 666 777 777 777 788 888 888 889 999 999 999 000 000 000 011 111 111 112 ]
[ 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 ]
#1 GAA GAT TAT CTA TTT TTC TAA GAA GTC AGT CTG GAG TTC AAC TTC AT- -AT CTT GTT TAA
#2 ... .. -... ..
#6 ... ..C ... .. -... ..
#12 ... .. -... ..
#18 ... .. -... ..
#20 ... .. -... ..
#37 ... .. -... ..
#sob .G. ..G CGC ..G C.. .G. -.C .C. .GA G.. .A. CG. ... G.T CC. GCT AGG ..C CA. ..G

[ 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 ]
[ 222 222 222 333 333 333 344 444 444 445 555 555 555 666 666 666 677 777 777 778 ]
[ 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 ]
#1 GAC AAG GAA GTC TAT AAA ATC CA- -CT TAG GAT ATG --- --- --- -AT AAG TAT CCT ---
#2 ... .. -T. ... .. ---
#6 ... .. -T. ... .. ---
#12 ... .. -... .. ---
#18 ... .. -T. ... .. ---
#20 ... .. -T. ... .. ---
#37 ... .. -T. ... .. ---
#sob ..T .C. ..G .A. G.. TCG C.T TTT T.. ..A ..C G.T AGT CCG GCG TTC ... .. T.. CAA

```

```

[ 444 444 444 444 444 444 455 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 ]
[ 888 888 888 999 999 999 900 000 000 001 111 111 111 222 222 222 233 333 333 334 ]
[ 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 ]
#1 --A GAG ATG GTT CAT T-- --- --- -GA CAA --- --T TG- -AA TAG CTA GTA AAA GCC CTA
#2 --. ... ... ... ... .-- --- --- -. ... --- --. ... -. ... ... ...
#6 --. ... ... ... ... .-- --- --- -. ... --- --. ... -. ... ... ...
#12 --. ... ... ... ... .-- --- --- -. ... --- --. ... -. ... ... ...
#18 --. ... ... ... ... .-- --- --- -. ... --- --. ... -. ... ... ...
#20 --. ... ... ... ... .-- --- --- -. ... --- --. ... -. ... ... ...
#37 --. ... ... ... ... .-- --- --- -. ... --- --. ... -. ... ... ...
#sob AG. .CA G.. CCC .C. .AT CCT AAG C.G ... CGA CG. ..C C.. .T. T.C A.T G.. AAT TG.

```

```

[ 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 555 556 ]
[ 444 444 444 555 555 555 566 666 666 667 777 777 777 888 888 888 899 999 999 990 ]
[ 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 ]
#1 TAG CGC AGC TAT AGG GAA ACA AGA AAG AAA CCG AGA CGC TGA AAA G-- -CC AGA GAA AC-
#2 ... ... ... ... ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. --. -. ... .. ... ..-
#6 ... ... ... ... ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. --. -. ... .. ... ..-
#12 ... ... ... ... ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. --. -. ... .. ... ..-
#18 ... ... ... ... ... .. ..A. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. --. -. ... .. ... ..-
#20 ... ... ... ... ... .. ..A. .-- -. ... .. ... .. ... .. ... .. --. -. ... .. ... ..-
#37 ... ... ... ... ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. ... .. --. -. ... .. ... ..-
#sob ATA TCT .T. A.A TA. T.. CA. GA. ..T ... .. ..A. ... ..T ... TAT TTT .A. ..G ..C

```

```

[ 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 ]
[ 000 000 000 111 111 111 122 222 222 223 333 333 333 444 444 444 455 555 555 556 ]
[ 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 ]
#1 --- GAG AAA TAA GGT TAA GTT AAT AAG GGC GCA CGG TGG ATG CCT AGG CAC TAG GAG CCG
#2 --- ... ..
#6 --- ... ..
#12 --- ... ..
#18 --- ... ..
#20 --- ... ..
#37 --- ... ..
#sob AAA ... .. T.. ... ..
[ 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 666 777 777 777 777 777 777 7]
[ 666 666 666 777 777 777 788 888 888 889 999 999 999 000 000 000 011 111 111 1]
[ 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 8]
#1 ATG AAG GAC GTG ACG AAC GAC GAC ATG CTT TGG GGA GCT GTA AGT AAG CCT TGA TCC A
#2 ... ..
#6 ... ..
#12 ... ..
#18 ... ..
#20 ... ..
#37 ... ..
#sob ... .. A ... .. TG ... ..

```

ANEXO 4 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA REGIÃO INTERGÊNICA AMPLIFICADA PELO PAR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS 13BF e 6R (CHEN *et al.*, 2005)

