



Universidade Norte do Paraná

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

MÁRCIA REGINA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENOTÍPICA, SOROTIPOS
E MUTACINAS EM *STREPTOCOCCUS MUTANS* ISOLADOS
DE PRÉ-ESCOLARES COM DIFERENTES EXPERIÊNCIAS
DE CÁRIE**

UNOPAR

Londrina
2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

**Dados Internacionais de catalogação-na-publicação
Universidade Norte do Paraná
Biblioteca Central
Setor de Tratamento da Informação**

R611a Rodrigues, Márcia Regina.
Associação da diversidade genotípica, sorotipos e mutacinas de Streptococcus mutans em isolados de pré-escolares com diferentes experiências de cárie / Márcia Regina Rodrigues. Londrina : [s.n], 2007.
xii; 67p.

Dissertação (Mestrado). Odontologia. Dentística Preventiva. Universidade Norte do Paraná.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Regina Célia Poli-Frederico

1- Odontologia - dissertação de mestrado – UNOPAR 2- Cárie dentária 3- Streptococcus mutans 4- Sorotipo 5- Mutacina 6- Reação em cadeia da polimerase . I- Poli-Frederico, Regina Célia, orient. II- Universidade Norte do Paraná.

CDU 616.314-089.27/.28

MÁRCIA REGINA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENOTÍPICA,
SOROTIPOS E MUTACINAS EM *STREPTOCOCCUS*
MUTANS ISOLADOS DE PRÉ-ESCOLARES COM
DIFERENTES EXPERIÊNCIAS DE CÁRIE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado
em Odontologia da Universidade Norte do Paraná,
para obter o Título de Mestre, pelo programa de
Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração:
Dentística com Ênfase à Área Preventiva

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Célia Poli-
Frederico

Londrina
2007

MÁRCIA REGINA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENOTÍPICA, SOROTIPOS E
MUTACINAS EM *STREPTOCOCCUS MUTANS* ISOLADOS DE PRÉ-
ESCOLARES COM DIFERENTES EXPERIÊNCIAS DE CÁRIE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Odontologia da Universidade Norte do Paraná, para obter o Título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

BANCA EXAMINADORA

1) Profª Drª Cristiane Yumi Koga Ito

Julgamento _____ Assinatura _____

2) Profª Drª Sandra Mara Maciel

Julgamento _____ Assinatura _____

3) Profª Drª Regina Célia Poli- Frederico

Julgamento _____ Assinatura _____

Londrina, 21 de dezembro de 2007.

“As partes não determinam o todo, mas o todo determina as partes. As peças só são legíveis quando postas no lugar; isoladas, a peça de um puzzle não significa nada”.

GEORGES PEREC

DEDICATORIA

Dedico esse trabalho:

A Deus pelo sopro de vida que me concedeu e pela oportunidade de viver nesse momento no mundo, ao mesmo tempo em que tantas pessoas tão especiais.

Aos meus pais Pedro e Geni, por terem me concebido e serem a essência de tudo o que é bom, simples, perfeito, grandioso e importante em minha vida.

Ao meu amado esposo Josmar, por entender (e às vezes não entender) minhas ausências, mas me apoiar incondicionalmente. Pois quando meus dedos tocavam os livros, separatas, xérox e teclados, deixavam de tocar minha alma gêmea...

Aos meus irmãos Paulo Sérgio, Luiz Carlos e Maria Ofélia, por saberem de onde viemos, como lutamos e se alegrarem com as conquistas de cada um.

Aos meus cunhados Nino, Cristina e Rosa, por tornarem a família ainda mais completa.

Aos meus sobrinhos Melissa, Daniel, Rafael/Kétlin, Fernanda, Thiago, Roberta, Lara, Júlia e Dante, por terem sido as crianças que nos deram esperanças de um mundo melhor.

A minha nova família: Carlos, Mônica, Kátia, Ulisses, Josmarzinho e seus filhos, pelo carinho que agora compartilhamos.

A minha secretária Suzana, pedra preciosa que cuidou de tudo para que eu pudesse me dedicar a essa pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Regina Célia Poli-Frederico, pela delicadeza e competência com que me conduziu em um mundo desconhecido e encantador, tornando possível a conquista de mais uma etapa. A ela transcrevo uma frase de Pablo Picasso: “Há pessoas que transformam o sol numa simples mancha amarela, mas há aquelas que fazem de uma simples mancha amarela o próprio sol”. Muito obrigada.

Aos meus amigos Wilson Trevisan Júnior, Seió Okabayashi, Vera Lúcia Giolo Pelanda, Alberto Parreira Neto, Emilia Irmã Scremin, Marisa Shizuko Ikeda Kitano e Maria Suênia C. S. Cezar, por cobrirem as minhas ausências no trabalho e me estimularem a crescer.

Ao Prof. Dr. Luiz Reynaldo de Figueiredo Walter, Coordenador do Curso de Mestrado em Odontologia da UNOPAR, professor na minha graduação, grande mestre e exemplo.

A todos os Professores do Mestrado, pela amizade, compreensão e transmissão dos conhecimentos. Por estarem sempre prontos em atender nossas dificuldades. Em especial a Flaviana Bombarda de Andrada Ferreira, Linda Wang, Alcides Gonini Júnior, Karen Barros P. Fernandes, Daniella Francisca G. Cefaly, Cássia Cilene Dezan Garbeline e a Sandra Mara Maciel pela disposição em colaborar com a estatística, deixando evidenciados os resultados de minha pesquisa.

Aos meus colegas de turma Luis S. Tanaka, Georges Garcia, Alessandro Takahashi, Flávio de Ávila Miguel, Rodrigo P. Guergolette, Thiago Veras Fernandes, Mônica Paganini, Christiana A. Salvador, Maria Paula J. Botelho, Sandra Marisol Lara, por todos os bons momentos de companheirismo e ajuda interpessoal e em especial à Vália P. B Troca, minha parceira de seminários e

clínica, pela constância e organização de nossas tarefas, tornando tudo de maneira simples e eficaz.

As alunas da iniciação científica da Odontologia: Augusta Piovezzan, Miula Portelinha Braga e Gabriela Ferracin, pela ajuda no laboratório.

As bibliotecárias, Justymara Fernanda, Cristielle, Terezinha, Dora e Ana por toda a atenção dispensada e por serem tão especiais e solícitas.

A Sra. Vera Martins, Secretária do Mestrado da UNOPAR, profissional dedicada e atenciosa.

A todos os funcionários que por trás dos bastidores fazem o funcionamento da instituição

A todos os amigos, colegas e pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

Rodrigues, Márcia Regina. **Avaliação da diversidade genotípica, sorotipos e mutacinas em *Streptococcus mutans* isolados de pré-escolares com diferentes experiências de cárie.** 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Norte do Paraná, Londrina.

RESUMO

Streptococcus mutans são freqüentemente isolados da placa dentária e de lesões cariosas, encontrados em praticamente todos os indivíduos com alta, média, até baixa prevalência de cárie. Porém a simples detecção destes microrganismos não implica no desenvolvimento da doença. A existência de grande diversidade genotípica nas espécies de *S. mutans* pode resultar na colonização da cavidade bucal por cepas com diferentes características de virulência. Os objetivos desse estudo foram avaliar a diversidade genotípica, a freqüência dos sorotipos *c*, *e* e *f* e os genes para as mutacinas I, II, III e IV pela reação em cadeia da polimerase (PCR) dos *S. mutans* isolados de pré-escolares sem e com história de cárie dentária. Os resultados mostraram que a diversidade genotípica foi positivamente correlacionada com alto ceo-d ($r = 0,891$, $P = 0,01$). O sorotipo *c* foi o mais predominante (80%). A infecção mista (*c* e *f*) foi evidenciada em 20% dos pré-escolares com cárie. Todos os isolados de *S. mutans* foram negativos para mutacinas I/III. No grupo livre de cárie, 40% dos isolados foram positivos para mutacinas II/IV e não houve amplificação para a mutacina II. Por outro lado, 70% dos pré-escolares com cárie mostraram genótipos positivos para mutacinas II/IV e 10% para mutacina II. Foi observada a relação positiva entre sorotipo e mutacina II/IV nos pré-escolares com cárie dentária ($r = 0,699$, $P < 0,05$). Esses resultados sugerem que a alta diversidade genotípica, múltiplos sorotipos e a presença do gene para mutacinas II/IV têm forte relação com a susceptibilidade à carie dentária.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*. Sorotipo. Mutacina. Cárie dentária. Reação em Cadeia da Polimerase.

Rodrigues, MR. **Analysis of genotypic diversity, serotypes and mutacins in isolated *Streptococcus mutans* from preschool children with different caries experiences.** 2007. 67 f. Dissertation (Master's Degree in Dentistry) Universidade Norte do Paraná, Londrina.

ABSTRACT

Streptococcus mutans are frequently isolated from the biofilm dental and from decaying lesions, found in practically all individuals with high, medium, and even low caries experience. However, the simple findings of such microorganisms don't imply in the dental caries development. The existence of the high genotypic diversity in *S. mutans* species may result in the oral cavity's colonization by strains with different virulence characteristics. The aims of this study were to evaluate the genotypic diversity, the frequency of serotypes *c*, *e* and *f* and the occurrence of genes for mutacins I, II, III and IV by reaction chain polymerase (PCR) of *S. mutans* in caries-free and with caries preschool children. The results showed that genotypic diversity was positively correlated with high dmf-t index ($r = 0.891$, $P = 0.01$). Serotype *c* was the most frequently found in the oral cavities (80%). The mixed infection (*c* and *f*) it was observed in 20% of the preschool children in the caries group. All tested *S. mutans* isolates were negative of genes for mutacins I/III. In the caries-free group, 40% of isolates were positive of genes for mutacins II/IV and did not yield amplicons of genes for the mutacin II. On the other hand, 70% of preschool children in the caries-active group showed positive genotypes and 10% of genes for mutacin II. It was observed the positive relationship between serotype and of genes for mutacins II/IV in the preschool children with dental caries ($r = 0.699$, $P < 0.05$). These results suggest that the high genotypic diversity, multiples serotypes and of genes for mutacins II/IV and have strong relationship with the susceptibility to dental caries.

Key Words: *Streptococcus mutans*, serotype, mutacin, dental caries, Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Dendrograma baseado nos perfis de AP-PCR. O coeficiente de Jaccard foi gerado à partir de análise UPGMA baseado na comparação da matriz de similaridade das linhagens isoladas de *Streptococcus mutans*. As setas indicam a presença de 5 genótipos distintos de *S. mutans* para a criança no. 2. 42
- Figura 2** - Distribuição dos genótipos dos isolados de SM com relação a severidade de cárie entre as crianças pertencentes aos CEMEIs de Londrina-PR. 44
- Figura 3** - Fotografia dos produtos amplificados pela PCR para os sorotipos de antigenicidade *c* e *f* dos isolados de *S. mutans*. Seta amarela - amostra positiva para o sorotipo *c* do *S. mutans* (727 pb). Seta vermelha - amostra positiva para o sorotipo *f* (316 pb). M = Marcador de peso molecular (Leader 50 pb). 45
- Figura 4** - Relação entre a experiência de cárie dentária e o sorotipo de SM isolados de crianças de 4 e 5 anos de idade pertencentes aos CEMEIs de Londrina-PR. 46
- Figura 5** - Severidade de cárie dentária e sorotipos de SM isolados das crianças de 4 e 5 anos de idade pertencentes ao CEMEIs de Londrina-PR. 46
- Figura 6** - Fotografia dos produtos amplificados pela PCR das mutacinas II (444 pb) e IV (1344pb). M = Marcador de peso molecular (Leader 250 pb). 47
- Figura 7** - Relação entre a experiência de cárie dentária e a distribuição dos genes de mutacinas II e IV nos isolados de SM das crianças de 4 e 5 anos de idade pertencentes aos CEMEIs de Londrina-PR. 49
- Figura 8** - Relação entre a severidade de cárie dentária e a distribuição de mutacinas II e IV. 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição das espécies de estreptococos do grupo mutans quanto ao sorotipo, principais polissacarídeos componentes da parede celular e os hospedeiros.....	18
Tabela 2 – Enzimas glicosiltransferase (GTF) expressas por <i>S. mutans</i>	30
Tabela 3 - Primers para PCR específica para os sorotipos <i>c</i> , <i>e</i> e <i>f</i> de <i>S. mutans</i>	38
Tabela 4 - <i>Primers</i> para PCR específica para os genes mutacinas I/III, II e IV de <i>S. mutans</i>	39
Tabela 5 - Distribuição no número de genótipos isolados de <i>S. mutans</i> das crianças de 4 e 5 anos de idade pertencentes ao CEMEIS de Londrina-PR (N = 20).	41
Tabela 6 – Relação entre a experiência de cárie e a diversidade genotípica isolados de <i>S. mutans</i> das crianças pertencentes ao CEMEIs de Londrina-PR (N = 20).	43
Tabela 7 - Distribuição dos sorotipos <i>c</i> , <i>e</i> e <i>f</i> de SM isolados das crianças de 4 e 5 anos de idade pertencentes aos CEMEIs Londrina-PR (N = 20).	45
Tabela 8 - Frequência dos genes para as mutacinas II e IV entre os isolados de SM das crianças de 4 e 5 anos de idade pertencentes aos CEMEIs de Londrina-PR (N = 20).	48
Tabela 9 - Experiência de cárie, sorotipo e mutacinas II e IV dos isolados de SM nas crianças pertencentes aos CEMEIs de Londrina-PR (N = 20).....	50
Tabela 10 - Severidade de cárie dentária, mutacinas II e IV e sorotipo dos isolados de SM.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase utilizando primers arbitrários

ceo-d – Dentes decíduos cariados, com extração indicada e obturados

CEMEIS – Centros municipais de educação infantil

DNA – Ácido desoxirribonucléico

GTF - Glicosiltransferase

OFRs – *Predicted Protein-Encoding Open Reading Frames*

p- Nível de significância

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PR – Paraná (estado brasileiro)

r- Coeficiente de correlação

RGP - ramnose-glicose

S. - Streptococcus

SM - *Streptococcus mutans*

SPSS – *Statistical Package for Social Science*

UNOPAR – Universidade Norte do Paraná

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i>	16
2.1.1 Diversidade Genética dos <i>S. Mutans</i>	19
2.1.2 Sorotipo	22
2.2 FATORES DE VIRURÊNCIA DOS <i>S. MUTANS</i>	24
2.2.1 Capacidade Acidogênica e Acidúrica	25
2.2.2 Síntese de Polissacarídeos Extracelulares	27
2.2.3 Produção de Bacteriocinas.....	30
3 OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GERAL.....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4 MATERIAIS E METODOS	36
4.1 ANÁLISE DOS DENDROGRAMAS PARA VERIFICAÇÃO DA DIVERSIDADE GENOTÍPICA DE <i>S. MUTANS</i>	37
4.2 ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS ESPECÍFICO PARA SOROTIPO DE <i>S. MUTANS</i>	38
4.3 ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES ENVOLVIDOS NA PRODUÇÃO DE MUTACINAS PELO <i>S. MUTANS</i>	39
4.4 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS	39
5 RESULTADOS	41
5.1 ANÁLISE DOS GENÓTIPOS DE <i>S. MUTANS</i>	41
5.2 ANÁLISE DO SOROTIPO DE ANTIGENICIDADE.....	44
5.3 ANÁLISE DOS GENES DAS MUTACINAS.....	47
5.4 RELAÇÕES ENTRE DIVERSIDADE GENOTÍPICA, SOROTIPOS E MUTACINAS	50

6 DISCUSSÃO	52
CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	66

1 INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença infecciosa e transmissível (KEYES, 1960; CAUFIELD, 1997) de origem multifatorial, que é caracterizada pela desmineralização dos tecidos calcificados que compõem o dente, em decorrência de um desequilíbrio da microbiota residente da cavidade bucal pela presença freqüente de carboidratos fermentáveis (MARSH, 1991; NYVAD, 1993; BOWDEN; EDWARDSSON, 1995).

A cárie é causada pela associação de três fatores primários: o hospedeiro, a microbiota e a dieta (KEYS, 1960), juntamente com o fator secundário, o tempo (NEWBRUN, 1988). Sendo finalmente, influenciada por condições sócio-econômicas, culturais e ambientais de uma população (BRATTHALL, 1992; MATTOS-GRANER et al., 2001a).

Dentre os microrganismos colonizadores da cavidade bucal, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*, SM) é considerado o de maior relevância devido aos seus fatores de virulência, e um dos agentes etiológicos da cárie dentária (HAMADA; SLADE, 1980; LOESCHE, 1986). Estas bactérias têm sido encontradas em praticamente todos os indivíduos incluindo aqueles que apresentam desde alta, média, até baixa prevalência de cárie (CARLSSON; OLSSON; BRATTHALL, 1985), porém a simples detecção destes microrganismos na saliva ou placa dental não justifica o desenvolvimento da doença. Uma possível explicação de sua presença em indivíduos com baixa experiência de cárie poderia ser que os fatores de virulência e os fatores de promoção de saúde podem diferir entre a população contrastando com a prevalência de cárie.

Muitos estudos têm demonstrado heterogeneidade genética entre cepas de *S. mutans*, (SAARELA et al., 1996; LI; CAULFIELD 1998; GRÖNROOS; ALALUUSUA 2000), entretanto a relação entre atividade de cárie e a diversidade genética do *S. mutans* continua controversa.

Estudos da biodiversidade de espécies cariogênicas podem ser promissores, visto que diferentes genótipos em um mesmo indivíduo podem variar na expressão das características patogênicas (KÖHLER; KRASSE, 1990, CAULFIELD, 1997; MATTOS-GRANER et al., 2001b).

A variabilidade genética é claramente considerada relevante no entendimento da virulência do *S. mutans* e a escolha de potencial alvo de medidas

preventivas. No entanto, pouco se sabe sobre a extensão da variação genômica do *S. mutans* ou sobre o mecanismo que gera essa diversidade (OLD; LOWES; RUSSEL, 2006).

Um dos fatores de virulência é atribuído à maioria dos microrganismos Gram-positivos que produzem pelo menos uma substância antimicrobiana chamada bacteriocina, sendo denominada de mutacina quando produzida pelo *S. mutans* (HAMADA; OSHIMA, 1975).

As mutacinas em virtude de suas propriedades biológicas de antagonismo seletivo, têm papel preponderante no processo de colonização e consolidação de uma cepa pioneira e cepas com alta produção dessas substâncias são mais facilmente transmitidas de um adulto para uma criança que outras cepas com baixa atividade mutacinolítica (GRONROOS et al, 1998).

O papel das mutacinas *in vivo* não está claro, porém a atividade antimicrobiana destas substâncias pode conferir uma vantagem ecológica para a produção de cepas na comunidade bacteriana do biofilme dental e pode também ser importante no estabelecimento do *S. mutans in vivo* (NAPIMOGA et al., 2005).

Talvez esse componente explique por que uma vez que os estreptococos do grupo *mutans* tornem-se estabelecidos, eles são dificilmente eliminados da biota bucal (ALALUUSUA, 1991)

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *STREPTOCOCCUS MUTANS*

Este organismo foi identificado pela primeira vez em lesões cáries profundas como cocobacilos cuja morfologia era mais oval que esférica por Clarke (1924) que denominou estes organismos de *S. mutans* por pensar que fossem mutantes de outros estreptococos.

A forma oval de algumas dessas células foi novamente descrita anos depois (COYKENDALL et al, 1971). O fator responsável pela mudança morfológica nesses organismos é a proporção $\text{HCO}_3^-/\text{K}^+$ no meio de cultura. Quando essa proporção é baixa, as células são ovais e quando a proporção é alta, as células são esféricas (TAO; TANZER; MACALISTER, 1987).

Streptococcus mutans é um organismo procariótico pertencente ao reino Bactéria, filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Streptococcaceae, gênero *Streptococcus* e espécie *S. mutans*. Os estreptococos são cocos que se agrupam em pares, ou em colônias lineares quando crescidos em meio líquido. Suas células esféricas ou ovóides medem de 0,5 a 2,0 μm de diâmetro, e não possuem órgãos de locomoção como cílios e flagelos. Os estreptococos são Gram-positivos e não formam esporos. A grande maioria desses organismos é saprófita, mas alguns são patogênicos (HOLT, 1994). Os estreptococos são catalase-negativos e o produto final do metabolismo fermentativo é principalmente o lactato (HOLT, 1994). A maioria dos estreptococos é anaeróbia facultativa, embora alguns sejam anaeróbios estritos. Estes microrganismos normalmente requerem um meio de cultura rico em nutrientes para crescer e a temperatura ótima de crescimento é 37°C.

Os estreptococos são bactérias que se dividem em apenas um plano. Como as bactérias não se separam facilmente após o plano de divisão, elas tendem a formar cadeias e, assim, podem diferenciar-se dos estafilococos que comumente se dividem em diferentes planos formando grupamentos semelhantes a cachos de uva.

O habitat primário do *S. mutans* é a superfície dental humana e, após ter colonizado a dentição, pode também ser encontrado na saliva, na língua,

nas mucosas e na superfície de próteses e aparelhos ortodônticos (ALALUUSUA et al., 1994). Este microrganismo também é capaz de causar inflamações oculares em neonatos e endocardite (PARKER; BALL, 1976; REEDER; WESTWELL; HUTCHINSON, 1985).

Os estreptococos orais são subdivididos em quatro grupos: *anginosus*, *mitis*, *mutans* e *salivarius* (FOX, 1999). As estirpes de estreptococos do grupo *mutans* podem ser divididas em 7 espécies distintas: *Streptococcus cricetus*, *S. downei*, *S. ferus*, *S. macacae*, *S. mutans*, *S. rattus* e *S. sobrinus*. Esta classificação é baseada em diferenças nas características genéticas, antigênicas e bioquímicas.

O gênero *Streptococcus* foi classificado de acordo com várias características: tipo de hemólise (α hemólise, β hemólise e ausência de hemólise), determinado por propriedades fisiológicas e bioquímicas e por propriedades antigênicas do polissacarídeo da parede (TRABULSI; ALTHEERTUM, 1999).

A classificação segundo critérios imunológicos com base na presença de antígenos de superfície celular (normalmente glicoproteínas) foi realizada pela pesquisadora Lancefield (1933) que identificou diversos antígenos de superfície que caracterizavam grupos distintos de espécies de estreptococos. Os grupos de antigenicidade foram então denominados de grupos de Lancefield, que foram nomeados por letras, de "A" a "O".

Uma outra classificação sorológica foi desenvolvida para este grupo de microrganismos por Bratthall (1970) e Perch, Kjems, Ravn (1974), que identificaram 8 sorotipos distintos (*a, b, c, d, e, f, g, h*), nos quais se encaixam as 7 espécies distintas de estreptococos do grupo *mutans* (Tabela 1).

Tabela 1 – Descrição das espécies de estreptococos do grupo mutans quanto ao sorotipo, principais polissacarídeos componentes da parede celular e os hospedeiros.

Espécie	Sorotipo	Principal polissacarídeo	Hospedeiro
<i>S. mutans</i>	<i>c, e, f</i>	Rha,Glc	Homem
<i>S. rattus</i>	<i>b</i>	Rha, Gal, Gro	Homem
<i>S. sobrinus</i>	<i>d, g</i>	Rha, Glc, Gal	Homem, Animais
<i>S. cricetus</i>	<i>a</i>	Rha, Glc, Gal	Ratos
<i>S. downei</i>	<i>h</i>	ND	Homens, Roedores
<i>S. macacae</i>	<i>c</i>	ND	Macacos
<i>S. ferus</i>	<i>c</i>	Rha, Glc	Macacos

Rha - rhamnose; Glc - glucose; Gal - galactose; Gro - glicerol; ND - não determinado.
Fonte: MAIDEN et al. (1992); WHILEY; BEIGHTON (1998).

As espécies do grupo mutans mais freqüentemente isoladas em humanos são os *S. mutans* e *S. sobrinus* (COYKENDALL, 1977; COYKENDALL, 1989; WHILEY; BEIGHTON, 1998), aparecendo com maior freqüência da placa dental e estão fortemente associados à cárie dentária humana (HAMADA; SLADE, 1980; LOESCHE, 1986; LINDQUIST; EMILSON, 1991; SEOW, 1998).

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 glucose e frutose, e unem os resíduos de glucose entre si por meio de ligações glicosídicas α -1,6 e α - 1,4 para formar glucanos insolúveis. Esses glucanos 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 glucanos aderentes e insolúveis e a subseqüente formação de ácidos, promovem a desmineralização do esmalte dentário e o início das lesões de cárie (LOESCHE, 1986; GRÖNROOS, 2000).

Além disso, o *S. mutans* 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 (GRÖNROOS, 2000).

O seqüenciamento completo do genoma do *S. mutans* (ADJIC et al., 1999), possibilitou um melhor entendimento da complexidade e especificidade genética deste organismo. A análise do seu genoma mostra que o *S. mutans* é capaz de metabolizar a mais vasta variedade de carboidratos, do que qualquer outro organismo Gram-positivo seqüenciado até hoje, sendo capaz de sintetizar todos os seus aminoácidos necessários. O número de proteases, peptidases e outras exoenzimas produzidas pelo *S. mutans* claramente sugerem que ele obtém recursos dos tecidos de seu hospedeiro. A análise da seqüência genômica mostrou que aproximadamente 16% de seus ORFs (*Predicted Protein-Encoding Open Reading Frames*) especificam genes únicos e revelaram 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 dentária (ADJIC et al., 1999).

2.1.1 Diversidade Genética dos *S. mutans*

Aproximadamente 260 espécies de bactérias bucais foram cultivadas de humanos, e a diversidade já foi estimada em 500 espécies comuns (BECKER et al., 2002). Em outros estudos, estima-se, que a cavidade bucal humana de um indivíduo adulto hospede cerca de 700 espécies bacterianas distintas, sendo que 50% destas não são cultiváveis nos meios de cultura desenvolvidos até hoje. Sendo de fundamental importância a utilização de técnicas de genética molecular, para identificar novas espécies não cultiváveis, uma vez que estas técnicas utilizam-se do DNA extraído de amostras microbianas bucais, sendo que os microrganismos não precisam estar viáveis para que sejam identificados (PASTER et al., 2001).

O biofilme dental é composto, portanto, por uma comunidade bacteriana complexa, que abriga diversos microrganismos e que está exposta à diferentes situações de estresse fisiológico, como excesso ou limitação de nutrientes, baixo pH, alta osmolaridade, oxidação e freqüente exposição a

antimicrobianos (MARSH, 1991). A adaptação a um ambiente altamente competitivo por transformação genética não ocorre frequentemente, porém, quando ocorre, pode ser altamente vantajosa para o microrganismo, podendo este adquirir um gene de resistência a um ou mais antibióticos ou um fator de virulência, promovendo grande vantagem seletiva (LI et al., 2001).

A habilidade de genótipos específicos de *Streptococcus mutans* para competirem com outras linhagens, é essencial para sua colonização. *S. mutans* é transmitido pela saliva e o estabelecimento precoce desta espécie na cavidade bucal está associado à alta incidência de cáries dentárias na dentição decídua (KÖHLER; ANDREEN; JONSSON, 1988; MATTOS-GRANER et al., 2000; LONGO; MATTOS-GRANER; MAYER, 2003). Crianças mais jovens geralmente possuem somente um tipo clonal de *S. mutans* e clones adicionais podem ser adquiridos ao longo do tempo como indicado pela alta diversidade clonal observada em indivíduos mais velhos (CAULFIELD et al., 1988).

Linhagens de *S. mutans* apresentam alta heterogeneidade genotípica e fenotípica (SAARELA et al., 1996; MATTOS-GRANER et al., 2000; MATTOS-GRANER et al., 2001b) e alguns genótipos devem ser capazes de colonizar o hospedeiro e induzir cárie dentária mais eficientemente do que outros genótipos. Esta hipótese é reforçada pelos achados de variações significantes na indução potencial de cárie em modelos animais quando diferentes linhagens de *S. mutans* foram comparadas (KÖHLER; KRASSE, 1990). Adicionalmente, variações em algumas características de virulência em isolados de *S. mutans* foram associadas com atividade de cárie nos hospedeiros infectados e sua habilidade de crescimento no biofilme (MATTOS-GRANER et al., 2000; MATTOS-GRANER et al., 2001b).

A avaliação da diversidade genotípica de isolados de estreptococos do grupo mutans demonstrou diversos números de genótipos detectados, variando de 1 a 5 genótipos diferentes por criança (KULKARNI; CHAN; SANDHAM, 1989; CAUFIELD; WALKER, 1989; ALALUUSUA et al., 1996; KREULEN et al., 1997; GRONROOS et al., 1998; REDMO EMANUELSSON; LI; BRATTHALL, 1998; MATTOS-GRANER et al., 2001b; KLEIN et al., 2002).

Entre estes estudos não há uma homogeneidade em relação ao período de acompanhamento da colonização por esses microrganismos e, não

existe também uma concordância entre o número de genótipos encontrados em relação à idade das crianças avaliadas. A existência de grande diversidade genotípica nas espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* pode resultar na colonização da cavidade bucal por cepas com diferentes características de virulência (KÖHLER; KRASSE, 1990), assim como diferentes origens (MATTOS-GRANER et al., 2001b; KLEIN et al., 2002).

No estudo realizado por Kulkarni, Chan e Sandham (1989) o número de genótipos variou conforme a idade das crianças. Crianças com 14, 9, 8 e 6 anos de idade abrigavam 3, 1, 5 e 3 genótipos, respectivamente.

Caulfield e Walker (1989) avaliaram o número de genótipos e encontraram apenas um único genótipo nas crianças com 14,7 meses de idade em média, em que o *S. mutans* foi detectado pela primeira vez no biofilme dessas crianças.

Redmo Emanuelsson et al. (2003) encontraram um máximo de 7 genótipos nos indivíduos com prévia experiência de cárie. Esses autores sugerem ainda que um grande número de genótipos pôde ser encontrado devido ao grande número de isolados analisados, o que aumenta a possibilidade de detectar diferentes genótipos.

Napimoga et al. (2004) realizando testes com OPA-02 e OPA-03, encontraram diferentes espectros de amplificação indicando polimorfismo genético. Quando os resultados com os dois primers foram combinados, encontrou-se no grupo sem cárie 1 ou 4 genótipos diferentes por indivíduo, e no grupo com cárie, 2 ou 8 genótipos por indivíduo. Os achados que indivíduos com cárie têm mais genótipos do que os sem cárie é contrário aos resultados de Kreulen et al. (1997) que mostram uma relação negativa entre atividade de cárie e diversidade genética, estando os resultados de Napimoga et al. (2004) de acordo com estudos anteriores (HIROSE et al., 1993, ALALUUSUA et al., 1996) que também evidenciaram que indivíduos com cárie têm um grande número de genótipos de *S. mutans*.

Um maior número de isolados pode fornecer dados mais precisos relacionados à presença de diferentes genótipos num mesmo indivíduo (GRONROOS et al., 1998). A existência de grande diversidade genotípica nas espécies pode resultar na colonização da cavidade bucal por cepas de diferentes características de virulência (KÖHLER; ANDREEN; JONSSON, 1988; MATTOS-

GRANER et al., 2000; MATTOS-GRANER et al., 2001a) assim como diferentes origens (MATTOS GRANER et al., 2001b; KLEIN et al., 2002).

Lembo et al. (2007) avaliaram 339 isolados de *S. mutans* coletados de diferentes nichos bucais de 10 crianças sem cárie e 11 com cárie de 5 a 8 anos de idade. Um isolado de cada genótipo foi testado quanto sua suscetibilidade ácida e habilidade de formar o biofilme. Foi encontrado um único genótipo em 7 crianças, enquanto as outras 14 crianças exibiram 2 a 7 genótipos. Não encontram diferença significativa no número de genótipos detectados nas crianças sem e com cárie. O estudo sugeriu que não há diferenças de distribuição dos genótipos de acordo com o sítio bucal e que populações de *S. mutans* diferem de acordo com a suscetibilidade e habilidade em formar o biofilme.

Estabilidade genotípica quer dizer a permanência de determinado genótipo colonizando um nicho específico, no caso a cavidade bucal, por um determinado período de tempo. Nesse ínterim, existem poucos relatos na literatura a respeito de estabilidade de genótipos de estreptococos do grupo mutans (CAUFIELD; WALKER, 1989; ALALUUSUA et al., 1994; EMANUELSSON; THORNQVIST, 2000; KLEIN et al., 2002).

Há suposições que as linhagens que colonizam a cavidade bucal podem se manter estáveis por diversos anos, embora alguns genótipos detectados inicialmente podem não ser novamente isolados anos mais tarde (CAUFIELD; WALKER, 1989; ALALUUSUA et al., 1994; EMANUELSSON; THORNQVIST, 2000).

2.1.2 Sorotipo

As linhagens de *Streptococcus mutans* são classificadas dentro de três sorotipos *c*, *e* e *f*, e a especificidade sorológica é definida pelo polissacarídeo ramnose-glicose (RGP) na parede celular (LOESCHE, 1986).

Os RGPs são compostos por um esqueleto de ramnose com ligação α 1,2- e α 1,3- na cadeia lateral de glicose alternada por ramnose. Cada polissacarídeo sorotipo específico apresenta uma única ligação com sua cadeia lateral: sorotipo *c*, ligação α 1,2; sorotipo *e*, ligação β 1,2; e sorotipo *f*, ligação α 1,3 (LINZER; REDDY; LEVINE, 1986; PRITCHARD et al., 1986).

Os genes envolvidos na biossíntese de polissacarídeos sorotipo específico de *S. mutans* têm sido clonados e seqüenciados e quatro genes *rml* (*rmlA*, *B*, *C* e *D*) estão relacionados à biossíntese da unidade de esqueleto de ramnose (TSUKIOTA et al., 1997). Adicionalmente, cinco genes (*rgpA*, *B*, *C*, *D*, *E* e *F*) participam da formação desta estrutura. Os genes *gluA* e *rgpE* participam da biossíntese da cadeia lateral de glicose (YAMASHITA et al., 1998a; YAMASHITA et al., 1998b).

A maioria dos indivíduos é colonizada com somente um sorotipo. De acordo com estudos iniciais, múltiplos sorotipos podem ser evidenciados em 10-20% dos indivíduos na maioria das populações (LOESCHE, 1986). Métodos de microbiologia molecular possibilitaram determinar a relação de isolados bacterianos mais precisamente e eles têm sido usados satisfatoriamente na detecção de diversidade genética e a transmissão de estreptococos do grupo mutans (CAUFIELD; WALKER, 1989; KULKARNI, CHAN, SANDHAM, 1989; KOZAI et al., 1991; SAARELA et al., 1993a; SAARELA et al., 1993b). Por esses métodos é possível mostrar que indivíduos podem ser colonizados por mais do que um tipo genético de *S. mutans* (ALALUUSUA et al., 1996).

Ozaki et al (2002) identificaram e caracterizaram os genes responsáveis pela formação da cadeia lateral de glicose do polissacarídeo ramnose-glicose (RGP) para o sorotipo *c* de *S. mutans*, estando localizados do loco *rgpA* até *rgpF*.

Embora o seqüenciamento do genoma inteiro da linhagem UA159 do *S. mutans* sorotipo *c* tenha sido realizado em 2002, os dados não foram suficientes para evidenciar fatores genéticos envolvidos na geração da especificidade de sorotipos (SHIBATA et al., 2003). Esses autores identificaram os lócus envolvidos na formação da cadeia lateral de glicose de RGP nos sorotipos *e* e *f* de *S. mutans* e confirmaram que essas regiões determinam a especificidade do sorotipo. Neste estudo ainda, desenharam 3 pares de primers a partir das seqüências de DNA específicas dentro de cada lócus determinante de cada sorotipo e desenvolveram PCR multiplex para identificar as linhagens de *S. mutans*. Adicionalmente avaliaram a aplicação clínica da PCR em amostras do biofilme dental e da saliva de pré-escolares com 3 e 4 anos de idade. Dos 437 pré-escolares 198 apresentaram *S. mutans* em sua saliva ou placa dental. Os isolados foram sorotipados pela PCR

multiplex. O sorotipo *c* predominou (85%), o sorotipo *e* foi o segundo mais comum (13%), sendo o mais raro o sorotipo *f* (1,9%) nestes pré-escolares Japoneses. A experiência de cárie no grupo com infecção por múltiplos sorotipos de *S. mutans* foi significativamente maior do que nos grupos com monoinfecção.

Estudos anteriores com isolados de culturas de biofilme humano também apontam que o sorotipo *c* é o mais prevalentemente detectado dos sorotipos do *S. mutans*, independente de idade, país, local de coleta da amostra ou isolamento e procedimento de sorotipagem. Nesses estudos o sorotipo *c* normalmente corresponde a 80% do total isolado (HAMADA et al., 1976; LOESCHE; GRENIER, 1976; MASUDA et al., 1979). Suspeita-se que o sorotipo *c* deva ser o progenitor dos outros sorotipos. As linhagens com sorotipo *e* e *f* devem ter sido originadas a partir de uma mutação pontual no locus determinante do sorotipo *c* ou uma deleção de uma porção deste locus (GRÖNROOS et al., 1995).

Em pesquisas mais recentes, *Streptococcus mutans* isolados de pacientes com bacteremia após extração dentária ou com endocardite infecciosa foram classificados como sorotipo *c* (FUGIWARA et al., 2001). Porém, duas linhagens não puderam ser classificadas como sorotipo *c*, *e* ou *f*, mostrando como característica uma drástica redução na cadeia lateral de glucose com esqueleto ramnose no polissacarídeo sorotipo específico. Sendo designadas como um novo sorotipo *k* e relatada em 2 a 5% das crianças japonesas (NAKANO et al., 2004a; NAKANO et al., 2004b).

2.2 FATORES DE VIRURÊNCIA DOS *S. MUTANS*

O termo virulência é a capacidade do microrganismo de causar doenças em um hospedeiro. A relação entre o hospedeiro e o microrganismo é dinâmica e dependente de características dos microrganismos, hospedeiro e de fatores externos. São pelos fatores de virulência que um determinado microrganismo entra, coloniza e cresce em um hospedeiro suscetível (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997).

Dentre os microrganismos colonizadores da cavidade bucal, *S. mutans* é considerado o de maior relevância devido aos seus fatores de virulência, e

vem sendo descrito como agente etiológico para a cárie dentária (HAMADA; SLADE, 1980; LOESCHE, 1986).

A virulência dessa espécie está diretamente relacionada à capacidade de metabolização da sacarose em polissacarídeos intra e extracelulares (relacionados com aderência), sua capacidade acidogênica e acidúrica, bem como produção de mutacinas, que são proteínas antibacterianas (bacteriocinas) capazes de inibir o crescimento de outras bactérias genética e ecologicamente relacionadas; sua síntese também pode estar diretamente relacionada com a transmissão de *S. mutans*, favorecendo a formação e manutenção da placa cariogênica na superfície dentária (JAKOB et al., 1953; HIROSE et al., 1993; GRÖNROOS et al., 1998).

Além da tolerância aos ácidos e produção de ácidos, os *S. mutans* ainda possuem como mecanismos 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). 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).

Os *S. mutans* podem ainda produzir hidrolases glicosídicas que extraem hidratos de carbono da saliva para utilização como fonte de energia (GRÖNROOS, 2000).

A influência de fatores de virulência de *S. mutans* na capacidade de colonização e indução da cárie dentária 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 et al, 1998b).

2.2.1 Capacidade Acidogênica e Acidúrica

A acidogenicidade é a capacidade de produção de ácidos, e aciduricidade é a capacidade de metabolização de substratos em meio ácidos, sendo estes os primeiros fatores de virulência de microrganismos específicos a serem relacionados à etiologia da cárie dentária (LOESCHE, 1986; KÖHLER; BIRKHED; OLSSON, 1995).

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

De Soet *et al.* (1991) observaram que os *S. sobrinus* eram mais acidogênicos do que os *S. mutans* em animais gnobióticos. Köhler, Birkhed, Olsson (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* isoladas 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.

Van Houte, Lopman e Kent (1996), avaliaram o pH final do meio de cultura rico em sacarose, após cultivo de amostras do biofilme de superfícies dentárias com diferentes condições clínicas (lesões de cárie, lesões de manchas brancas em esmalte, lesões de cárie ativa e superfícies hígidas) e 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 do biofilme das superfícies dentárias com lesões, sugerindo que a cariogenicidade do biofilme é dependente do aumento na proporção de organismos acidogênicos e acidúricos.

Apesar dos estudos demonstrarem grande variabilidade na cariogenicidade de linhagens isoladas de humanos em modelos animais, pouco se sabe sobre os fatores bacterianos relacionados a estas diferenças (BOWDEN, 1997).

2.2.2 Síntese de Polissacarídeos Extracelulares

O evento inicial na colonização bacteriana é aderência de microrganismos às diferentes superfícies e ocorre de um modo seletivo (GIBBONS, 1984). O número de células bacterianas viáveis e sua capacidade de aderência são pré-requisitos fundamentais para o sucesso da colonização microbiana (GIBBONS; VAN HOUTE, 1975). Na cavidade bucal, somente as superfícies da mucosa (palato, gengival, dorso de língua, mucosa jugal) são suscetíveis à colonização durante os primeiros meses de vida. Após a erupção dos dentes, ocorre um aumento significativo do número de locais disponíveis para a aderência (sulco gengival ou bolsa e superfícies duras dos dentes ou dos materiais restauradores). As bactérias não se aderem somente às superfícies bucais, mas também a outras bactérias, formando comunidades multigenéricas em que o padrão de relação específica influencia sua composição e estabelecimento (KOLENBRANDER; ANDERSEN, 1986).

A formação do biofilme dental ocorre em duas fases distintas. Durante a primeira fase, proteínas de superfície bacteriana interagem com o hospedeiro ou com produtos bacterianos adsorvidos à superfície dentária. Na segunda fase, um biofilme se forma com bactérias acumuladas pela coagregação com a mesma espécie ou com outras espécies e produção de uma matriz polissacarídica extracelular (KOLENBRANDER, 2000).

Streptococos do grupo mutans expressam algumas adesinas importantes na colonização inicial dos dentes (DEMUTH et al., 1990), entretanto, não são considerados bons colonizadores primários dos dentes já que há outros estreptococos orais que apresentam adesinas de maior afinidade à película adquirida, tais como *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. gordonii* e *S. oralis* (KOLENBRANDER; LONDON, 1993). As espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* secretam várias proteínas extracelulares que podem estar envolvidas na colonização de superfícies orais, sendo importantes na segunda fase do desenvolvimento do biofilme dental e em atividades metabólicas que levam à iniciação da lesão de cárie dentária (HAMADA; SLADE, 1980; LOESCHE, 1986). Essas proteínas extracelulares incluem glicosiltransferases, frutossiltransferases, dextranases, frutanases, proteínas ligantes de glicano e proteínas associadas à parede – receptores de superfície SpaP

(também denominados como Pac, antígeno I/II, B, P1, SR MLS-1 e IF) e antígeno A associado à parede - WapA (AJDIC et al., 2002).

S. mutans sintetizam polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose, o que lhes permite a aderência ao dente. Para Loesche (1986), os glucanos insolúveis (com ligações α -1,3) são de significância patológica na cárie dentária de superfície lisa em animais, quando uma dieta rica em sacarose é consumida. Se a sacarose é ingerida em intervalos freqüentes entre as refeições, a queda de pH da placa torna-se mais freqüente, aumentando assim a chance para a desmineralização dos tecidos dentais. Os glucanos são sintetizados por enzimas extracelulares denominadas glicosiltransferases (GTF), que hidrolisam as moléculas de sacarose e polimerizam as moléculas de glicose liberadas. Essas enzimas podem estar ligadas à superfície das células do *S. mutans*, livres no meio extracelular, ou adsorvida a película adquirida (HAJISHENGALLIS; MICHALEK, 1999).

Dentre as características patogênicas do *S. mutans*, a mais importante é essa capacidade de adesão à superfície dental mediada pela metabolização da sacarose. Este organismo sintetiza glucanos a partir da sacarose pela atividade de três enzimas glicosiltransferases (GTF). Três GTFs foram identificadas em *S. mutans*, as quais são codificadas pelos genes (gtfB, gtfC e gtfD) (OOSHIMA et al., 2001).

A sacarose serve como substrato para diversas enzimas extracelulares que sintetizam polímeros importantes na colonização e na patogênese da cárie. Alguns dos polímeros sintetizados a partir da sacarose promovem a aderência e acúmulo bacteriano na superfície dentária. Outros polímeros fornecem uma fonte de carboidratos para o metabolismo durante períodos de escassez de nutrientes. A importância dos polissacarídeos extracelulares de *S. mutans* na cariogenicidade é evidenciada por pesquisas que mostram a redução na virulência em mutantes incapazes de sintetizar esses polímeros (SCHROEDER; MICHALEK; MACRINA, 1989; MUNRO; MICHALEK; MACRINA, 1991; YAMASHITA et al., 1993).

As glicanas participam ativamente na adesão do *S. mutans* ao esmalte (OOSHIMA et al., 2001). Juntamente com as glicanas, *S. mutans* também sintetiza as proteínas que se ligam as glicanas, GbpA, GbpB e GbpC que são

codificadas pelos genes *gbpA*, *gbpB* e *gbpC*, respectivamente (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001a). *S. mutans* também é capaz de sintetizar, a partir da sacarose, frutanas extracelulares que contribuem para a formação do biofilme cariogênico. Linhagens de *S. mutans* incapazes de sintetizar frutossiltransferase são menos cariogênicas (MUNRO; MICHALEK; MACRINA, 1991).

Estudos realizados em cepas mutantes para *gtfB* e *gtfC* demonstram a diminuição na habilidade de *S. mutans* em se acumular em biofilmes *in vitro* e *in vivo* (TSUMORI; KURAMITSU, 1997) e, neste sentido, as Gtfs são os fatores de virulência que têm despertado grande interesse no desenvolvimento de métodos de controle de infecção por *S. mutans*, como, por exemplo, as vacinas anti-cáries testadas em modelos animais e humanos (SMITH *et al.*, 1993).

De acordo com Hamada e Kuramitsu (1988), três GTFs distintas, secretadas pelo *S. mutans*, estão bem caracterizadas tanto bioquímica quanto ao nível molecular (Tabela 2):

1) GTFB – codificada pelo gene *gtfB*, que sintetiza glicanos insolúveis em água, tendo ligações glicosídicas principais α -1,3;

2) GTFC – codificada pelo gene *gtfC*, que sintetiza uma mistura de glicanos solúveis e insolúveis, os primeiros apresentando ligações glicosídicas principais α -1,6;

3) GTFD – codificada pelo gene *gtfD*, que sintetiza basicamente glicanos solúveis. A Tabela 2 mostra as GTFs expressas por cepas de *S. mutans*.

Tabela 2 – Enzimas glicosiltransferase (GTF) expressas por *S. mutans*

Espécie	Cepa	Enzima	Massa molec.	Gene	Glucano
<i>S. mutans</i>	GS-5	GTF-B	165,8	<i>gtfB</i>	Ligações α -1,3
<i>S. mutans</i>	GS-5	GTF-C	153,0	<i>gtfC</i>	Ligações α -1,3 e α -1,6
<i>S. mutans</i>	GS-5	GTF-D	159,0	<i>gtfD</i>	Ligações α -1,6

Fonte: Hamada e Karamitsu (1988)

Yamashita et al. (1993) avaliaram a cariogenicidade de cepas de *S. mutans* que não expressavam cada um dos genes *gtf* em ratos com dieta rica em sacarose (56%). As cepas que não expressavam a *gtfB*, induziram um número de 2 a 5 vezes menor de lesões de cárie e produziram apenas 69% de glicanos insolúveis, quando comparadas com as cepas selvagens. As cepas mutantes que não expressavam *gtfC*, induziram a formação de cárie, cerca de 1,5 a 4 vezes menor e produziram 84% do glicano insolúvel. Já as cepas que não expressavam ambas as *gtfB* e *C* praticamente não produziram glicano insolúvel e mostrou uma incidência de cárie de 2 a 5 vezes menor.

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 glicanos insolúveis e capacidade de adesão ao vidro, sugerindo que cepas de crianças com alta atividade de cárie podem colonizar melhor promovendo a cárie dentária.

2.2.3 Produção de Bacteriocinas

A maioria dos microrganismos Gram-positivos produz pelo menos uma substância antimicrobiana chamada bacteriocina. (HAMADA; OSHIMA, 1975).

As bacteriocinas são da família de peptídeos sintetizados pelos ribossomos, são proteínas produzidas pelas bactérias para matar ou inibir o crescimento de cepas fortemente relacionadas e sua biogênese é por meio de modular o crescimento de microrganismos competidores ocupando o mesmo nicho ecológico (HALE et al., 2005).

Bacteriocinas são, portanto, substâncias proteínicas antibacterianas que algumas bactérias produzem para interferir no crescimento de outras bactérias, geralmente filogeneticamente relacionadas.

A maioria dos *S. mutans* produzem bacteriocinas que são denominadas mutacinas e são capazes de inibir o crescimento de bactérias genética e ecologicamente relacionadas, assim como também inibir o crescimento de outras bactérias Gram-positivas (QI; CHEN; CAUFIELD, 2001). Em ambientes de alta complexidade populacional, como o biofilme dental, parece que a capacidade de sintetizar mutacina pode beneficiar as cepas produtoras sendo, porém, desconhecido o seu papel *in vivo* (BALAKRISHNAN et al., 2002).

Mutacinas são classificadas em duas famílias: as lantibióticas (contendo resíduos de lantioninas e/ou β -metiltionina) e não lantibióticas. A classificação das linhagens produtoras de mutacina baseadas na sua atividade bactericida, sensibilidade para outras ou para a própria mutacina produzida e presença de plasmídios, divide as mutacinas em quatro tipos I, II, III e IV (CAULFIELD et al., 1985; QI; CHEN; CAUFIELD, 1999; QI; CHEN; CAUFIELD, 2001). Os genes estruturais dos prepeptídeos de mutacinas I, II, III e IV (*mutA*) foram seqüenciados (QI; CHEN; CAUFIELD, 1999; QI; CHEN; CAUFIELD, 2000; QI; CHEN; CAUFIELD, 2001).

As mutacinas podem apresentar um importante papel biológico na regulação e composição do biofilme dental, tanto na atividade de sinergismo ou antagonismo, sugerindo que o largo espectro de mutacinas pode ser mais importante na colonização e estabilização das espécies cariogênicas, mantendo e estabelecendo nichos e atividade microbiana altamente complexa (NAPIMOGA et al., 2005).

A capacidade de produção de mutacina pode favorecer a instalação e colonização de estreptococos do grupo mutans aumentando o risco de cárie (GRÖNROOS et al., 1998). Mas Alaluusua (1991) não encontrou correlação positiva

entre atividade mutacínica e o número de estreptococos cariogênicos no biofilme dental (risco de cárie), entretanto, Fabio et al. (1987) mostraram associação positiva entre as proporções de *S. mutans* com o total de estreptococos bucais e o potencial mutacínico.

O espectro antimicrobiano da mutacina IV é especificamente contra membros do grupo mitis dos streptococos orais, enquanto que as mutacinas I, II e III são mais amplas (KAMIYA et al., 2005a).

Qi, Chen, Caufield (2001) encontraram a presença de mutacina IV em mais de 50% das amostras de *S. mutans* analisadas. Diferentes mutacinas podem servir a diferentes propósitos durante o processo de colonização do *S. mutans*. A mutacina IV seria produzida por células planctônicas, enquanto que a mutacina I seria sintetizada pelas células do biofilme. A mutacina IV parece ser importante na fase inicial de colonização, eliminando os colonizadores primários, os *S. sanguinis*, já que seu espectro antimicrobiano é específico contra essas espécies. Após o estabelecimento do *S. mutans* na superfície dental, inicia a síntese de mutacina I, pelas células do biofilme, agindo na inibição de competidores potenciais de diversas espécies. Suportando essa hipótese, o espectro antimicrobiano da mutacina IV é especificamente contra membros do grupo mitis de estreptococos bucais (QI; CHEN; CAUFIELD, 2001). Contudo, estudos sugerem que a alta complexidade da microbiota, como a que é encontrada nos indivíduos cárie-ativos, é causada pelos *S. mutans* que produzem um largo espectro de mutacina, incluindo as mutacinas I, II e III, podendo tornar-se prevalente na maioria dos sítios bucais (NAPIMOGA et al., 2004).

Longo, Mattos-Graner e Mayer (2003) analisaram 19 cepas isoladas de crianças e encontraram que apenas uma cepa mostrava ampliações homólogas para o gene da mutacina II, nenhum dos isolados clínicos mostraram homologia para as mutacinas I ou III. Esses autores relataram não haver associação entre o espectro inibitório da mutacina e o nível de infecção por estreptococos mutans ou incidência de cárie no hospedeiro, sugerindo que a produção de mutacina pode não ser relevante na habilidade das cepas em colonizar o hospedeiro e induzir doença.

Kamiya et al. (2005a) encontraram que linhagens de *S. mutans* removidos de indivíduos cárie-ativos, mostraram maior frequência de detecção de

mutacina IV do que os *S. mutans* retirados de indivíduos livres de cárie. E que apenas o *S. mutans* do grupo cárie-ativos apresentaram ampliações correspondentes aos genes para a mutacina I/III. Esse estudo avaliou a frequência das mutacinas I, II, III e IV em cepas de *S. mutans* vindos de indivíduos cárie-ativos e livres de cárie e comparou com o perfil fenotípico dessas substâncias *in vitro*. Os resultados sugeriram alta diversidade e polimorfismo na produção de determinantes genéticos de substâncias semelhantes à mutacina. Além disso, a produção de largo espectro de mutacinas pode ter um importante papel biológico na colonização por cepas de *S. mutans*, mantendo um nicho com alta complexidade microbiana.

Algumas pesquisas já realizadas apontam a relação inversa entre o número de *S. mutans* e *S. sanguinis* (CAUFIELD, 2000). Sendo esse último microrganismo reconhecido por seu papel de antagonismo na cárie dental (LOSCHKE et al., 1975) e na doença periodontal (SOCRANSKY et al. 1988). Pelo reduzido potencial cariogênico do *S. sanguinis*, sugere-se que a sua proporção com relação ao *S. mutans* poderia ser utilizada como indicador de risco a cárie. O *S. sanguinis* é considerado um colonizador primário, predominando em número quando em condições ambientais favoráveis. Se ocorrer queda do pH da cavidade bucal, devido a ingestão de carboidratos fermentáveis, seu número diminui e a quantidade de *S. mutans* aumenta, predominando o meio (VAN HOUTE et al 1991). Variados fatores podem influenciar a relação inversa entre *S. mutans* e *S. sanguinis*, como tolerância ao meio ácido, compatibilidade com receptores específicos e a produção de mutacinas.

A avaliação do papel dos peptídeos *NlmA* e *NlmB* que compõem a mutacina IV das cepas de *S. mutans* UA159, evidenciou que seu espectro antimicrobiano é mais extenso do que lhe foi atribuído. Quando testados contra 18 indicadores de cepas que não foram sensíveis a mutacina IV, diminuíram a atividade inibitória contra todas as cepas, mas 3 cepas apresentaram um gene para uma mutacina nova adicional, o que fez com que houvesse a sugestão por parte dos autores, em dar seqüência a nomenclatura, nomeando-a mutacina V (HALE et al., 2005).

Kamiya et al. (2005b) avaliaram a relação entre a diversidade genética e a produção de mutacina em indivíduos afetados com cárie e livres de cárie. Os resultados mostraram significativa variação na produção de mutacina e

espectro de inibição em ambos os grupos, com possível associação entre a atividade mutacínica e distintos padrões de colonização de *S. mutans* nos dois grupos. Observaram ainda que, linhagens do mesmo genótipo de *S. mutans* mostraram diferentes perfis de mutacina, sugerindo um alto grau de diversidade interlinhagens, o que levou os autores a concluir que a produção de mutacina parece ter importância clínica na colonização do *S. mutans* e é altamente diversa nessa espécie.

Nicolas et al. (2006) apresentam um procedimento simples para produção e purificação de mutacinas, mostrando que a seqüência de amino ácidos da mutacina H-29B produzida pelo *S. mutans* 29B é idêntica a já conhecida mutacina II. Concluíram que, linhagens de *S. mutans* de origens completamente diferentes podem produzir diversas bacteriocinas similares.

Kreth et al. (2006) demonstraram que a produção de fatores de virulência, como a mutacina IV, está regulada pela alta densidade celular assim como, por um sistema regulatório de competência.

Hillman et al. (2007) desenvolveram cepas geneticamente modificadas de *Streptococcus mutans* para prevenção da cárie dentária. Tais cepas apresentavam significativa redução na cariogenicidade por apresentarem excelente potencial de colonização por meio da produção de um antibiótico natural chamado de mutacina 1140.

Robson et al. (2007) mostraram que linhagens do *Streptococcus mutans* K8 produzem um novo tipo de antibiótico All, a mutacina K8, que está codificada no locus muk, pois quando o locus muk é inativado fica evidenciado que a mutacina K8 é responsável pela maioria da atividade inibitória, produzidas pelas cepas K8, aparentemente atribuída à mutacina IV ou a algum outro peptídeo inibitório exportado pelo transportador nImT da mutacina IV.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar isolados de *Streptococcus mutans* quanto a diversidade genotípica, ao sorotipo específico, genes codificadores de mutacinas em crianças sem cárie dentária e com história desta doença.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

S. mutans isolados dos pré-escolares de 4 e 5 anos de idade sem cárie dentária e com história desta doença foram utilizados para:

- Investigar a diversidade genotípica pela Reação em Cadeia da Polimerase utilizando primers arbitrários (AP-PCR);
- Identificar os sorotipos de antigenicidade *c*, *e* e *f* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Avaliar a frequência de quatro diferentes genes para mutacina (I, II, III e IV) pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Analisar a existência de associação entre os diferentes genótipos, sorotipos, frequência dos genes para mutacina e a experiência de cárie.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

No ano de 2004 e 2005 foi desenvolvido um estudo transversal, tendo como população de estudo de pré-escolares de 4 e 5 anos de idade, pertencente a 11 Centros de Educação Infantil (CEMEIs) da cidade de Londrina-PR.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNOPAR (Anexo 1) e foi requerida a autorização oficial da direção das creches e o termo de consentimento livre e esclarecido, enviados e assinados pelas mães das crianças.

O exame das condições bucais foi baseado na prevalência da cárie dentária, utilizando o índice ceo-d seguindo os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997). Para análise dos dados, trabalhou-se com experiência de cárie, em que o índice ceo-d foi dicotomizado em 2 grupos: sem cárie (ceo-d = 0) e com cárie (ceo-d > 1). Além disso, usando-se como ponto de corte o valor do índice igual a 3, foram definidos 2 grupos: de baixa e alta severidade de cárie, ceo-d < 3, respectivamente. Os exames foram conduzidos sob luz natural, em condições ambientes, com o auxílio de espelho clínico e sonda para remoção de detritos.

Posteriormente foram selecionados aleatoriamente, 10 crianças com cárie e 10 sem cárie, totalizando uma amostra de 20 pré-escolares.

Esta amostra de estudo foi submetida à coleta de saliva, estimulando-a por 1 minuto com película de parafina e coletada pelo método da espátula de madeira, descrito por Köhler e Bratthall (1979). Semeou-se a saliva em superfície de ágar mitis salivarius bacitracina (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973) e incubadas em estufa a 37° C, durante 48 horas. Com auxílio de microscópio estereoscópico (Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, SP), foram retiradas 10 colônias suspeitas de pertencerem aos estreptococos do grupo mutans. Cada colônia foi transferida para um microtubo contendo meio BHI e incubadas por 24h em jarras de anaerobiose.

Esta cultura da bactéria isolada foi submetida à extração simplificada de DNA e armazenada por congelamento em freezer a -4°C, para ser utilizado quando necessário. As amostras de *S. mutans* isolados foram identificadas pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com *primers* que flanqueiam o gene

Glicosiltransferase (GTFB-F e GTFB-R - 517 pb) descritos previamente por Oho et al., 2000. Em seguida a AP-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase utilizando Primers Arbitrários) foi realizada com o primer OPA-02 e OPA-13 descritos por Li e Caufield (1998).

Os isolados descritos anteriormente foram alvos de análise genética por meio da PCR para identificação de sorotipo específico e detecção de presença de mutacina, pois estavam devidamente acondicionados sob refrigeração, o que possibilitou investigações adicionais com o intuito de caracterização das linhagens de *Streptococcus mutans* que pudessem estar relacionadas com a atividade da cárie dental.

4.1 ANÁLISE DOS DENDROGRAMAS PARA VERIFICAÇÃO DA DIVERSIDADE GENOTÍPICA DE *S. MUTANS*

A análise comparativa dos géis foi realizada no estudo anterior a partir do alinhamento dos mesmos, considerando cada marcador de tamanho de bandas de DNA como ponto de referência. As bandas de DNA identificadas para cada uma das amostras foram utilizadas para a construção de uma matriz binária, na qual o valor zero representava a ausência da banda de DNA para a linhagem analisada e um, a presença da banda de DNA. Esta matriz foi analisada usando o algoritmo do Coeficiente de Similaridade de Jaccard, o qual não considera as similaridades negativas, isto é, a ausência do produto. A escala de valores deste coeficiente varia de zero, para dissimilaridade total, a um para similaridade total entre as linhagens. A matriz de coeficientes de similaridade genética gerada foi utilizada para a obtenção de agrupamento pelo método UPGMA, na construção de dendrogramas utilizando o programa de computador NTSYS-PC (ROHLF, 2000). A avaliação dos dendrogramas foi realizada para a verificação da diversidade genotípica dos isolados de *S. mutans* em pré-escolares de 4 e 5 anos de idade sem cárie dentária e com história desta doença.

4.2 ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS ESPECÍFICO PARA SOROTIPO DE *S. MUTANS*

Foram avaliados 200 isolados clínicos e uma linhagem de referência de *S. mutans* quanto aos sorotipos *c*, *e* e *f*. Os *primers* específicos para os sorotipos foram os descritos por Shibata et al. (2003) e estão apresentados na Tabela 03.

As condições da PCR multiplex específica para os sorotipos *c*, *e* e *f* constituíram de 0,2 mM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfatado, 10 mM do Tampão (pH8,0), 2mM MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase, 0,5 μM de cada primer e 1μL de amostra de DNA. Após a desnaturação a 94°C por 5 min, um total de 35 ciclos foram realizados; cada ciclo consistiu por 15s de desnaturação a 96°C, 30s de pareamento a 61°C e 1min de extensão a 72°C, seguido de um ciclo de extensão a 72°C por 5 min. Os amplicons foram separados pela eletroforese em gel de agarose (1%). O gel foi corado com brometo de etídeo, visualizado por meio da luz ultravioleta e fotografado com câmera digital Nikon 5S.

Tabela 3 - Primers para PCR específica para os sorotipos *c*, *e* e *f* de *S. mutans*.

Primer	Seqüência (5' a 3')	pb*	Referência
SC-F	CGG AGT GCT TTT TAC AAG TGC TGG	727	Shibata et al. (2003)
SC-R	AAC CAC GGC CAG CAA ACC CTT TAT		
SE-F	CCT GCT TTT CAA GTA CCT TTC GCC	517	Shibata et al. (2003)
SE-R	CTG CTT GCC AAG CCC TAC TAG AAA		
SF-F	CCC ACA ATT GGC TTC AAG AGG AGA	316	Shibata et al. (2003)
SF-R	TGC GAA ACC ATA AGC ATA GCG AGG		

* pb - tamanho do fragmento em pares de base

4.3 ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES ENVOLVIDOS NA PRODUÇÃO DE MUTACINAS PELO *S. MUTANS*

Primers que são homólogos aos genes *mutA* codificadores do tipos I, II, III e IV de mutacinas foram desenhados baseados nas seqüências obtidas do GenBank como mostrado na Tabela 04. Cada mistura da PCR (10 μ L) consistiu de tampão (1x) com MgCl₂ 7mM, 200 μ mol de cada *primer*, 1U Taq DNA polimerase e 50 ng de amostra de DNA. Após a desnaturação a 94°C por 5 min, as condições da PCR incluíram 30 ciclos de desnaturação a 92°C por 30s, pareamento a 55°C por 30 s, extensão a 72°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 5min. Os amplicons foram separados pela eletroforese em gel de agarose (1%). O gel foi corado com brometo de etídeo, visualizado por meio da luz ultravioleta e fotografado com câmera digital Nikon 5S.

Tabela 4 - *Primers* para PCR específica para os genes mutacinas I/III, II e IV de *S. mutans*.

<i>Primer</i>	Seqüência (5' a 3')	pb*	Referência
<i>Mut I/III-F</i>	AGTTTCAATAGTTACTGTTGC	750/450	Qi <i>et al.</i> (1999)
<i>Mut I/III-R</i>	GCCAAACGGAGTTGATCTCGT		
<i>Mut II-F</i>	AACGCAGTAGTTTCTTTGAA	444	Novak <i>et al.</i> (1994)
<i>Mut II-R</i>	TTCCGGTAAGTACATAGTGC		
<i>Mut IV-F</i>	ATGGGATATTTAAAGGGAAA	1344	Qi <i>et al.</i> (2001)
<i>Mut IV-R</i>	TCAGAGCAGCTACAAAACT		

* pb - tamanho do fragmento em pares de base

4.4 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

Os dados obtidos em cada avaliação permitiram determinar a diversidade genética, o sorotipo específico e a freqüência dos genes para mutacinas nos isolados analisados. Dados que foram tratados estatisticamente pela utilização do pacote estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 15 –

(correlação de Pearson ou Spearman, teste de Qui-quadrado) e correlacionados com a experiência de cárie nas crianças. O nível de significância utilizado foi $p < 0,5$.

5 RESULTADOS

Para o presente estudo, 200 isolados de *Streptococcus mutans* foram coletados de um grupo de 20 crianças de 4 a 5 anos de Centros Municipais de Educação Infantil (CEMEIs) de Londrina-PR, de maneira aleatória quanto a presença ou ausência de cárie dentária. Quando se avaliou a presença e ausência de cárie, observaram-se proporções idênticas de crianças sem histórico de cárie e com história desta doença (50%). Com relação à severidade de cárie, observou-se a mesma proporção entre baixa e alta severidade desta doença (25%).

5.1 ANÁLISE DOS GENÓTIPOS DE S. MUTANS

Analisando-se a frequência de genótipos obteve-se os seguintes resultados, 30% das crianças apresentaram apenas 1 genótipo, outros 30 % apresentaram 2 genótipos, 25 % apresentaram 3 genótipos diferentes e 15% demonstraram abrigar 5 genótipos diferentes em suas amostras de saliva (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição no número de genótipos isolados de *S. mutans* das crianças de 4 e 5 anos de idade pertencentes ao CEMEIS de Londrina-PR (N = 20).

	No. de Crianças	%
1	6	30
2	6	30
No. de Genótipos	3	25
	5	15

A figura 1 mostra 5 genótipos distintos de *S. mutans* presentes na saliva de um dos pré-escolares avaliados.

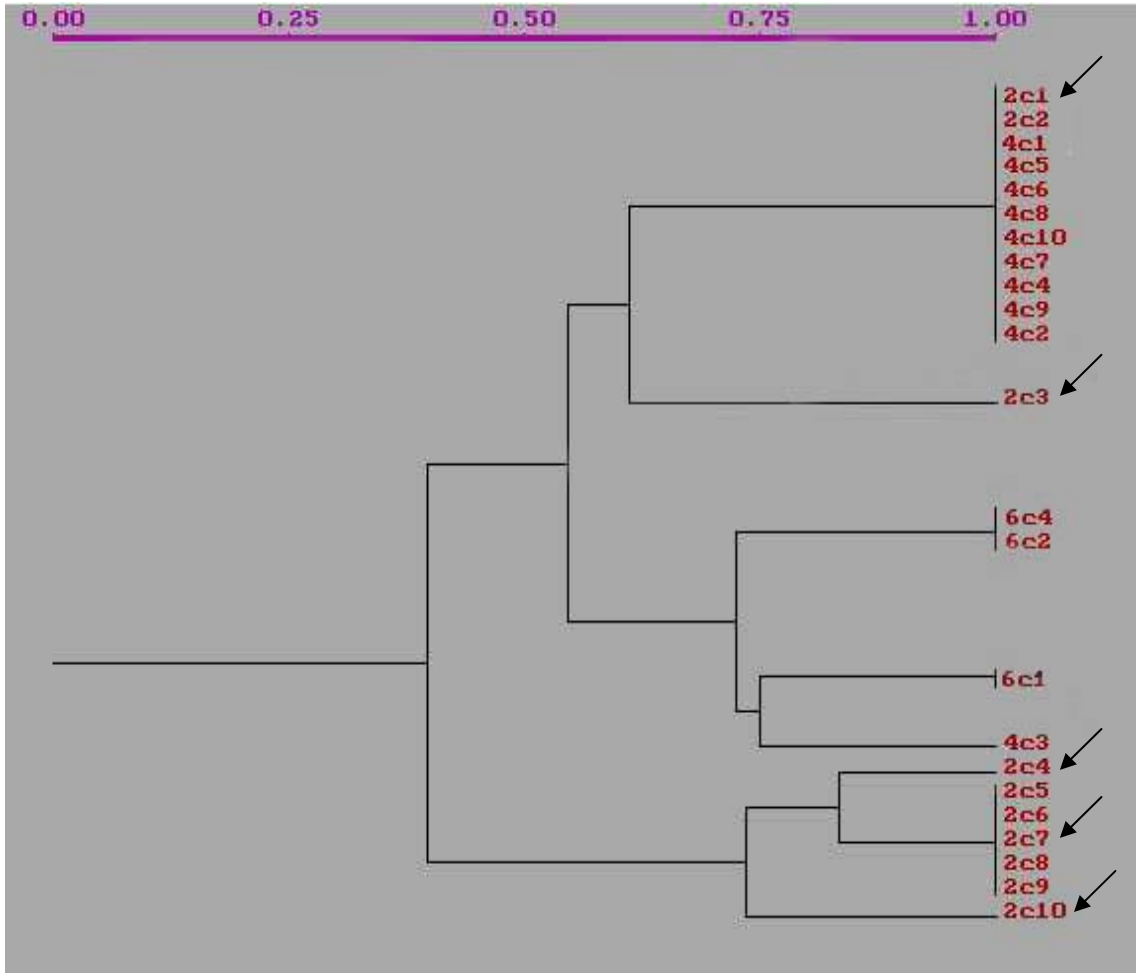


Figura 1 - Dendrograma baseado nos perfis de AP-PCR. O coeficiente de Jaccard foi gerado à partir de análise UPGMA baseado na comparação da matriz de similaridade das linhagens isoladas de *Streptococcus mutans*. As setas indicam a presença de 5 genótipos distintos de *S. mutans* para a criança no. 2.

Como demonstrado na Tabela 6, mais da metade (60%) dos isolados de *S. mutans* das crianças sem cárie apresentaram somente 1 genótipo. O restante mostraram 2 genótipos. Já para o grupo de crianças com histórico de cárie, 50% dos *S. mutans* tinham 3 genótipos e 30% com 5 genótipos diferentes. Uma menor proporção (20%) apresentaram 2 genótipos distintos.

Tabela 6 – Relação entre a experiência de cárie e a diversidade genotípica isolados de *S. mutans* das crianças pertencentes ao CEMEIs de Londrina-PR (N = 20).

Experiência de cárie	Diversidade genotípica			
	1	2	3	5
Sem cárie				
N	6	4	-	-
(%)	(60)	(40)		
Com história de cárie				
N	-	2	5	3
(%)		(20)	(50)	(30)

As crianças com baixa severidade de cárie apresentaram SM com 2 e 3 genótipos distintos (40 e 60%, respectivamente). Um dado interessante é mostrado pelos pré-escolares com alta severidade de cárie em que não ocorreram isolados de SM com 1 e 2 genótipos, mas 40% deles com 3 e 60% com 5 genótipos diferentes (Figura 2).

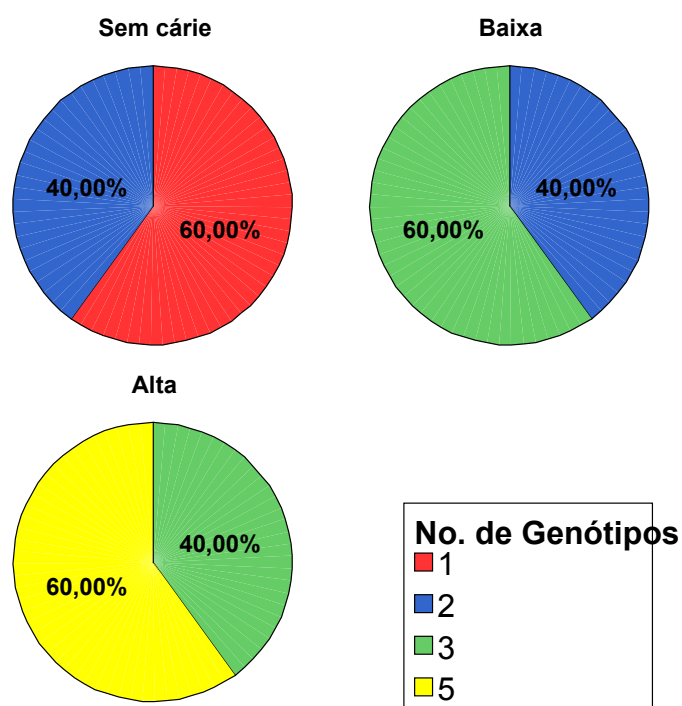


Figura 2 - Distribuição dos genótipos dos isolados de SM com relação a experiência de cárie entre as crianças pertencentes aos CEMEIs de Londrina-PR.

5.2 ANÁLISE DO SOROTIPO DE ANTIGENICIDADE

Na tabela 7 pode-se constatar que 90% dos isolados de *S. mutans* de crianças apresentaram sorotipo *c* e 10 % sorotipos *c* e *f*. Salientando que o sorotipo *e* não foi identificado nas amostras analisadas. Os produtos da amplificação por meio da PCR para os sorotipos *c* e *f* podem ser vistos na Figura 3.

Tabela 7 - Distribuição dos sorotipos *c*, *e* e *f* de SM isolados das crianças de 4 e 5 anos de idade pertencentes aos CEMEIs Londrina-PR (N = 20).

Sorotipo	N	%
Sorotipo <i>c</i>	18	90,0
ambos (<i>c</i> e <i>f</i>)	2	10,0

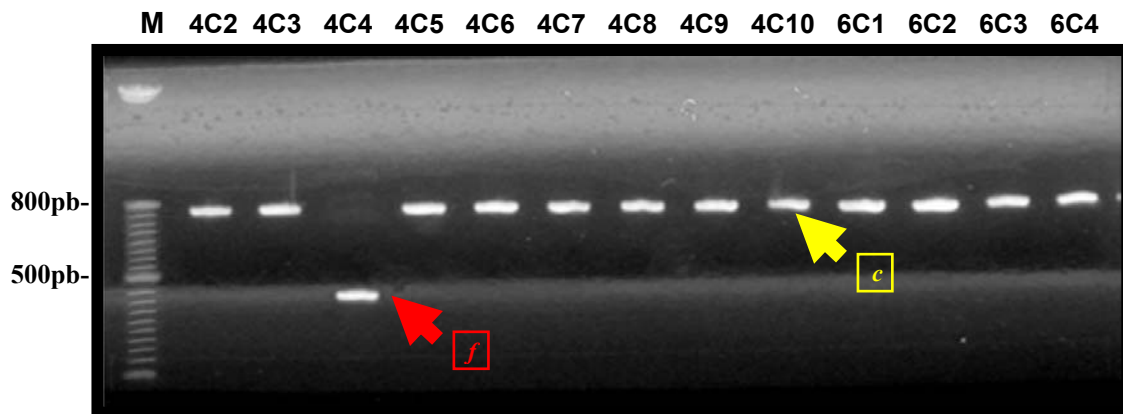


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR para os sorotipos de antigenicidade *c* e *f* dos isolados de *S. mutans*. Seta amarela - amostra positiva para o sorotipo *c* do *S. mutans* (727 pb). Seta vermelha - amostra positiva para o sorotipo *f* (316 pb). M = Marcador de peso molecular (Leader 50 pb).

Correlacionando-se a experiência de cárie com o sorotipo de SM encontrado nas crianças, pode-se verificar que 100% dos isolados de SM das crianças sem cárie apresentavam apenas o sorotipo *c* e nas crianças com histórico de cárie, 80% dos isolados tinham apenas o sorotipo *c* e 20% continham ambos os sorotipos *c* e *f* (Figura 4).

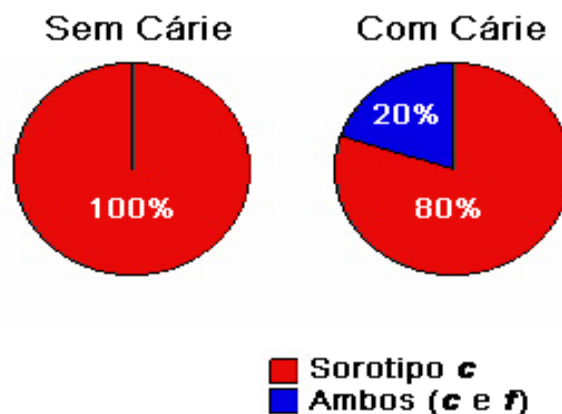


Figura 4 - Relação entre a experiência de cárie dentária e o sorotipo de SM isolados de crianças de 4 e 5 anos de idade pertencentes aos CEMEIs de Londrina-PR.

Proporções similares de sorotipo *c* (80%) e ambos os sorotipos *c* e *f* (20%) foram encontradas entre as crianças com baixa e alta severidade de cárie. Enquanto que as livres desta doença apresentaram somente o sorotipo *c* (Figura 5).

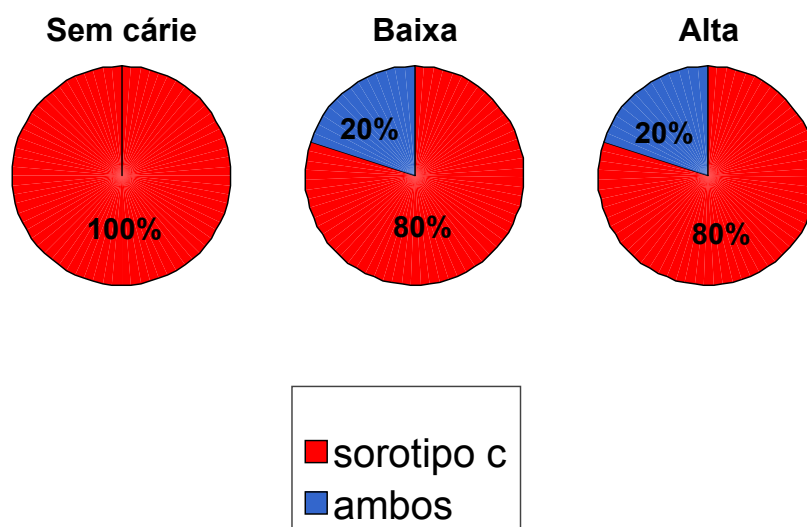


Figura 5 - Severidade de cárie dentária e sorotipos de SM isolados das crianças de 4 e 5 anos de idade pertencentes ao CEMEIs de Londrina-PR.

5.3 ANÁLISE DOS GENES DAS MUTACINAS

Os isolados de *S. mutans* foram submetidos à PCR e geraram fotos do gel de agarose visualizados em luz ultravioleta como o exemplo mostrado na Figura 6.

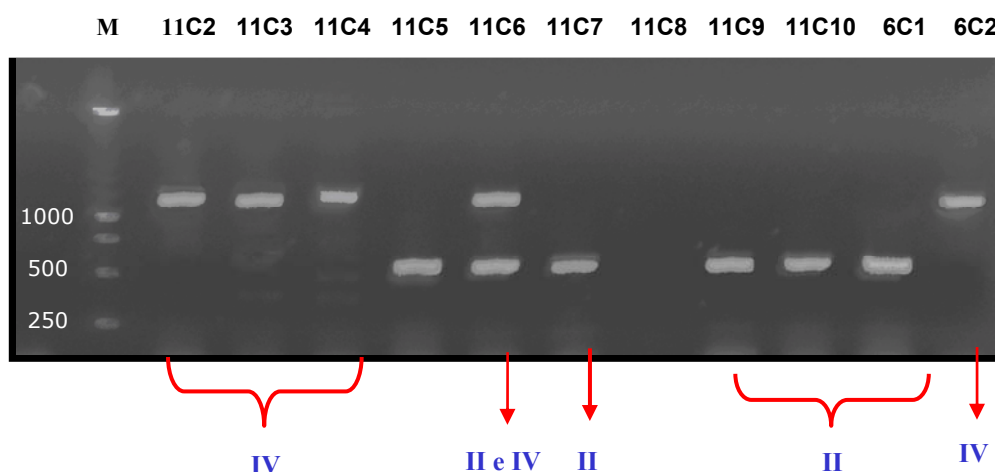


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR das mutacinas II (444 pb) e IV (1344pb). M = Marcador de peso molecular (Leader 250 pb).

Nenhum isolado de *S. mutans* das salivas das crianças apresentou expressão para o gene das mutacinas I e III, sendo, portanto todos negativos para essa bacteriocina. Como pode ser observado na Tabela 8, apenas as mutacinas II e IV foram encontradas, constando que 30% dos isolados de *S. mutans* das crianças continham nenhuma destas mutacinas, 5% apresentaram a mutacina II, 10 % apresentaram a mutacina IV. Vale ressaltar que a maior proporção foi observada para a combinação II e IV das mutacinas apresentadas pelos isolados de *S. mutans* (55%).

Tabela 8 - Frequência dos genes para as mutacinas II e IV entre os isolados de SM das crianças de 4 e 5 anos de idade pertencentes aos CEMEIs de Londrina-PR (N = 20).

Mutacinas II e IV	N	%
Nenhuma das mutacinas	6	30
Mutacina II	1	5,
Mutacina IV	2	10
Ambas	11	55

Contrastando-se a experiência de cárie com a frequência dos genes para presença de mutacina os resultados obtidos foram: no grupo das crianças livres de cárie 40% dos isolados de SM apresentaram nenhuma mutacina, 20% abrigavam a mutacina IV e 40% ambas mutacinas. Nas crianças com histórico de cárie, 20% apresentaram nenhuma das mutacinas, 10% apresentaram a mutacian II e a presença de ambas as mutacinas atingiu a taxa de 70% (Figura 7).

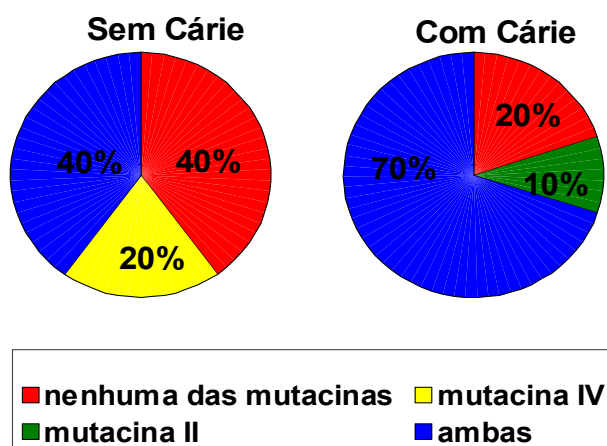


Figura 7 - Relação entre a experiência de cárie dentária e a distribuição dos genes de mutacinas II e IV nos isolados de SM das crianças de 4 e 5 anos de idade pertencentes aos CEMEIs de Londrina-PR.

A Figura 8 demonstra que a maioria dos isolados de SM pertencentes ao grupo de crianças com baixa severidade cárie, apresentou ambas as mutacinas (80%). Nas crianças com alta severidade de cárie, 20% dos isolados apresentaram a mutacina II e 60% apresentaram ambas as mutacinas. No grupo livre de ataque de cárie 40% dos isolados analisados não apresentaram nenhuma das mutacinas II e IV.

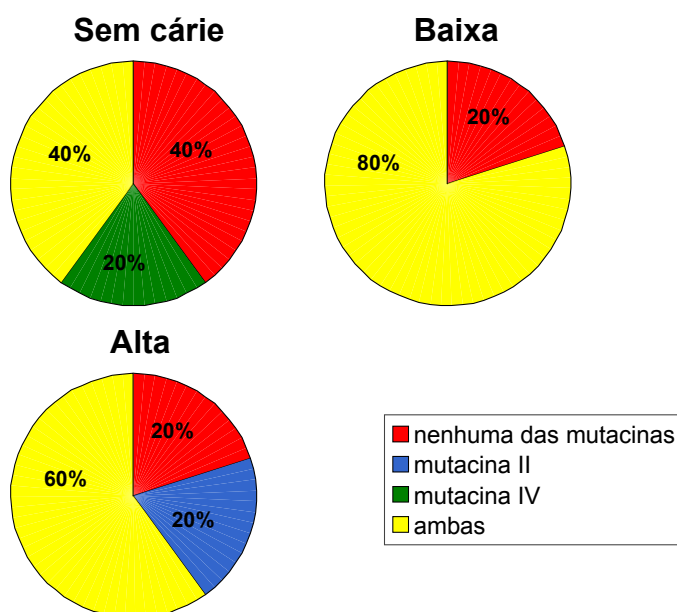


Figura 8 - Relação entre a severidade de cárie dentária e a distribuição de mutacinas II e IV.

5.4 RELAÇÕES ENTRE DIVERSIDADE GENOTÍPICA, SOROTIPOS E MUTACINAS

Os isolados de SM do grupo de crianças com cárie apresentaram-se como sendo do sorotipo *c* e abrigando ambos os genes das mutacinas II e IV (87,5%), enquanto que os isolados das crianças livres de cárie todos sorotipo *c*, apresentaram proporções similares para nenhuma das mutacinas e mutacinas II e IV (40%). Vale ressaltar que os isolados de SM com ambos os sorotipos (*c* e *f*) das crianças com história da doença apresentaram taxas semelhantes para nenhuma das mutacinas e mutacina II como pode ser visualizado na Tabela 9.

Tabela 9 - Experiência de cárie, sorotipo e mutacinas II e IV dos isolados de SM nas crianças com diferentes experiências de cárie (N = 20).

Experiência de carie	Sorotipo	Nenhuma das mutacinas	Mutacina II	Mutacina IV	Ambas
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Sem cárie	<i>c</i>	4 (40)	-	2 (20)	4 (40)
Com história de cárie	<i>c</i>	1 (12,5)	-	-	7 (87,5)
	Ambos (<i>c,f</i>)	1 (50)	1 (50)	-	-

Vale ressaltar que houve correlação inversa ($r = 0,69$) do grupo das crianças com cárie dentária entre presença dos genes para mutacinas II e IV e o sorotipo *c* isoladamente. Nas crianças livres do ataque de cárie este resultado não foi observado.

A Tabela 10 demonstra que as crianças com baixa severidade de cárie associada com sorotipo *c* de seus isolados de SM apresentaram ambas as mutacinas, e quando associadas ao sorotipo *c* e *f*, a totalidade das crianças apresentaram ausência de mutacina. Com relação às crianças com alta severidade de cárie e com sorotipo *c*, 25% não apresentaram presença de mutacina ou mesmo mutacina II e IV isoladamente, atingindo a marca de 75% para as crianças com ambas as mutacinas.

A criança com alta severidade de cárie, mas com ambos sorotipos (*c* e *f*), apresentou apenas a mutacina II.

Tabela 10 - Severidade de cárie dentária, mutacinas II e IV e sorotipo dos isolados de SM.

Severidade de cárie	Sorotipo	Mutacinas II e IV							
		nenhuma das mutacinas		mutacina II		mutacina IV		Ambas	
		N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Sem cárie	<i>c</i>	4	(40)	-		2	(20)	4	(40)
Baixa	<i>c</i>	-		-		-		4	(100)
	ambos	1	(100)	-		-		-	
Alta	<i>c</i>	1	(25)	-		-		3	(75)
	ambos	-		1	(100)	-		-	

Ao se proceder a estratificação do ceo-d de acordo com a classificação de severidade, encontrou-se forte correlação ($r = -1$) entre os genes para ambas as mutacinas II e IV e o sorotipo de *S. mutans* nas crianças com baixo índice de cárie.

Houve forte correlação ($r = 0,891$) entre a severidade de cárie e a diversidade genotípica dos isolados de SM. O número de genótipos aumentou com a elevação do índice de cárie.

6 DISCUSSÃO

Estudos sobre a diversidade genotípica de isolados de estreptococos do grupo mutans, relatam diferentes números de genótipos detectados, variando de 1 a 5 genótipos diferentes por criança (KULKARNI; CHAN; SANDHAM, 1989; CAUFIELD; WALKER, 1989; ALALUUSUA et al., 1996; KREULEN et al., 1997; GRONRROS et al., 1998; REDMO EMANUELSSON; LI; BRATTHALL, 1998; MATTOS-GRANER et al., 2001b; KLEIN et al., 2002).

Outros estudo apontam 7 genótipos diferentes (REDMO EMANUELSON et al., 2003, LEMBO et al., 2007) até 8 genótipos distintos (NAPIMOGA et al., 2004) sugerindo que um maior número de genótipos pôde ser encontrado devido ao grande número de isolados analisados, o que aumenta a possibilidade de detectar diferentes genótipos.

Napimoga et al. (2004) concluíram em seus estudos que, indivíduos cárie ativos albergavam um maior número de genótipos de *S. mutans* quando comparado com genótipos isolados de indivíduos livres de cárie.

Lembo et al. (2007) não encontraram diferença significativa no número de genótipos detectados em crianças sem e com cárie.

No presente estudo verificou-se que as crianças sem experiência de cárie apresentaram menor números de genótipos que as crianças com experiência dessa doença. Havendo interessante correlação entre o número de genótipos e a doença cárie, com um gradativo aumento de genótipos de acordo com a estratificação da cárie.

A maioria dos indivíduos é colonizada com somente um sorotipo. De acordo com estudos iniciais, múltiplos sorotipos podem ser evidenciados em 10-20% dos indivíduos na maioria das populações (LOESCHE, 1986).

Nos estudos de Shibata et al. (2003) o sorotipo *c* predominou (85%), o sorotipo *e* foi o segundo mais comum (13%), sendo o mais raro o sorotipo *f* (1,9%). A experiência de cárie no grupo com infecção por múltiplos sorotipos de *S. mutans* foi significativamente maior do que nos grupos com monoinfecção.

Os achados do presente estudo mostraram 80% de predominância do sorotipo *c* para a população avaliada. Com relação ao achado de 20% para o sorotipo *f* e ausência do sorotipo *e*, acreditamos que estudos com maiores

amostragens deveriam ser feitos para comparar aos parâmetros encontrados na literatura.

A capacidade de produção de mutacina pode favorecer a instalação e colonização de estreptococos do grupo mutans e aumentar o risco de cárie (GRÖNROOS et al., 1998). Alaluusua et al. (1991) não encontraram correlação positiva entre atividade mutacínica e o número de estreptococos cariogênicos no biofilme dental (risco de cárie), entretanto, Fabio et al. (1987) mostraram associação positiva entre as proporções de *S. mutans* com o total de estreptococos bucais e o potencial mutacínico.

Algumas pesquisas já realizadas apontam a relação inversa entre o número de *S. mutans* e *S. sanguinis* (CAUFIELD 2000). Sendo esse último microrganismo reconhecido por seu papel de antagonismo na cárie dental (LOSCHKE et al., 1975) e na doença periodontal (SOCRANSKY et al. 1988). Pelo reduzido potencial cariogênico do *S. sanguinis*, sugere-se que a sua proporção com relação ao *S. mutans* poderia ser utilizada como indicador de risco a cárie.

Diferentes mutacinas podem servir a diferentes propósitos durante o processo de colonização do *S. mutans*. A mutacina IV seria produzida por células planctônicas, enquanto que a mutacina I seria sintetizada pelas células do biofilme. A mutacina IV parece ser importante na fase inicial de colonização, eliminando os colonizadores primários, os *S. sanguinis*, já que seu espectro antimicrobiano é específico contra essas espécies. Após o estabelecimento do *S. mutans* na superfície dental, inicia a síntese de mutacina I, pelas células do biofilme, agindo na inibição de competidores potenciais de diversas espécies. Suportando essa hipótese, o espectro antimicrobiano da mutacina IV é especificamente contra membros do grupo mitis de estreptococos bucais (QI; CHEN; CAUFIELD, 2001).

Contudo, estudos sugerem que a alta complexidade da microbiota, como a que é encontrada nos indivíduos cárie-ativos (Napimoga et al. 2004), é causada pelos *S. mutans* que produzem um largo espectro de mutacina, incluindo as mutacinas I, II e III, podendo tornar-se prevalente na maioria dos sítios bucais. Kamiya et al. (2005a) encontraram que linhagens de *S. mutans* removidos de indivíduos cárie-ativos, mostraram maior frequência de detecção de mutacina IV do que os *S. mutans* retirados de indivíduos livres de cárie. E que apenas o *S. mutans*

do grupo cárie-ativos apresentaram ampliações correspondentes aos genes para a mutacina I/III.

Nas crianças sem cárie, os achados desta pesquisa mostram que nenhuma das mutacinas e ambas as mutacinas (II e IV) tiveram os mesmos índices percentuais. Nelas foi detectada apenas a mutacina IV.

Não foi detectada a presença da mutacina II nas amostras de isolados de *S. mutans* das crianças sem cárie, tendo sido encontrada apenas nas crianças com atividade dessa doença. O percentual de ambas as mutacinas para o grupo com cárie foi bastante elevado.

Não foram identificadas as mutacinas I e III em nenhum dos dois grupos, o que também ocorreu nos achados de Longo, Mattos-Graner e Mayer (2003).

É fundamental o entendimento dos fatores que interferem na capacidade dos estreptococos mutans de colonizarem a cavidade bucal e se estabelecerem no biofilme dental. De forma que a caracterização da capacidade de aderência em cepas transitórias e estáveis e sua correlação com a expressão de genes relevantes a este processo podem fornecer importantes dados para o desenvolvimento de métodos de controle de infecção e identificação de colonizadores mais agressivos da cavidade bucal. O que pode ainda, revelar dados mais precisos dos fatores que interferem ou colaboram para o sucesso de colonização por determinados genótipo de *S. mutans*.

O presente estudo avaliou e relacionou a diversidade genética, sorotipo específico e a produção de mutacinas pelos *S. mutans* em crianças com diferentes experiências de cárie dentária, mas hábitos alimentares e de higiene bucal, exposição a fluoretos, que podem interferir nos resultados, não foram avaliados nesta pesquisa.

No entanto, tal estudo pretendeu avaliar uma determinada população de pré-escolares de 4 a 5 anos de idade com intuito de comparar e de alguma forma corroborar, com o resultado de estudos já feitos em diferentes lugares do Brasil e em diversas partes do mundo.

Em última instância, pode-se afirmar que a influência da diversidade genotípica e dos fatores de virulência na habilidade de colonização dental e indução de cárie, necessita de investigações adicionais.

CONCLUSÃO

Por meio desse estudo pode-se concluir que:

- Os pré-escolares sem cárie apresentaram menor diversidade genotípica em relação aos pré-escolares com experiência de cárie.
- Os pré-escolares com história de cárie apresentaram múltiplos sorotipos (c e f).
- Ocorreu maior proporção dos genes da mutacina II e IV no grupo dos pré-escolares com história de cárie dentária.
- Os genes da mutacina IV foi encontrada somente nos pré-escolares livres de cárie.
- Os genes da mutacina II foi encontrada somente nos pré-escolares com cárie dentária.
- Houve uma relação positiva entre o número de genótipos e a severidade de cárie apresentada pelos pré-escolares.
- Houve uma correlação estatisticamente significativa entre os pré-escolares com cárie, sorotipo e mutacina.
- A maior diversidade de genótipos, a presença de genes para mutacinas II/IV e múltiplos sorotipos apresentam forte relação com a experiência de cárie. O que pode identificar que estes fatores influenciam na cariogenicidade dos isolados de *S. mutans*.

REFERÊNCIAS

- AJDIC, D. et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.96, p.14434-14439, 1999.
- AJDIC, D. et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 99, n. 22, p. 14434-9, oct. 2002.
- ALALUUSUA, S. Transmission of Mutans streptococci. **Proc. Fin. Dent. Soc.**, Helsinki, v.87, n.4, p.443-447, 1991.
- ALALUUSUA, S. et al. Mutacin activity of strains isolated from children with varying levels of mutants streptococci and caries. **Arch. Oral Biol.**, Elmsford, v.36, n.4, p.251-255, 1991.
- ALALUUSUA, S. et al. The demonstration by ribotyping of the stability of oral *Streptococcus mutans* infection over 5 to 7 years in children. **Arch. Oral Biol.**, Elmsford, v.39, n.6, p.467-471, 1994.
- ALALUUSUA, S. et al. Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. **Arch. Oral Biol.**, Elmsford, v.41, n.2, p.167-173, 1996.
- BALAKRISHNAN, M.; SIMMONDS, R. S.; KILIAN, M. Different bacteriocin activities of *S. Mutans* reflect distinct phylogenetic lineages. **J Med Microbiol**, Edinburgh and Livingstone, v.51, n.11, p.941-948, nov. 2002.
- BECKER, M. R. et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.40, n.3, p.1001-1009, 2002
- BOWDEN, G. H. Does assessment of microbiol composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v.25, n.1, p.76-81, feb. 1997.
- BOWDEN, G. H.; EDWARDSSON, S. Ecologia oral e a cárie dentária. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**. São Paulo: Ed. Santos, 1995. p.45-62.
- BRATTHALL, D. Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. **Odontol. Revy**, Lund, v.21, p.143-152, 1970.
- _____. 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.**, Elmsford, v.30, n.3, p.265-268, 1985.

CAUFIELD, P. W. Dental caries: a transmissible and infectious disease revisited: a position paper. **Pediatric Dentistry**, Chicago, v.19, n.8, p.491-97, nov-dec. 1997.

CAUFIELD P. W. Natural history of *S. sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. **Infect Immun**, Washington, v. 68, n.7, p.4018-4023, jul. 2000.

CAUFIELD, P. W. et al. Distinct bacteriocin groups correlate with different groups of *Streptococcus mutans* plasmids. **Infect. Immun.**, Washington, v.48, n.1, p.51-56, Apr.1985.

CAUFIELD, P. W. et al. Plasmid-containing strains of *Streptococcus mutans* cluster within family and racial cohorts: implications for natural transmission. **Infect. Immun.**, Washington, v.56, n.12, p.3216-3220, dec. 1988.

CAUFIELD, P. W.; WALKER, T. M. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphisms. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.27, n.2, p.274-278, feb.1989.

CLARK, J. K. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. **Br. J. Exp. Path.**, London, v.5, p.141-147, 1924.

COYKENDALL, A. L. Proposal to elevate the subspecies of *Streptococcus mutans* to species status based on their molecular composition. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v.27, n.1, p.26-30, 1977.

_____. Classification and identification of the viridans streptococci. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.2, p.315-328, 1989.

COYKENDALL, A. L. et al. DNA-DNA hybridization studies of *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res.**, Washington, v.50, p.1131-1139, 1971.

DEMUTH, D. R. et al. Comparison of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* receptors for human salivary agglutinin. **Microb. Pathog.** v. 9, n. 3, p. 199-211, Sept. 1990.

DE SOET, J. J. et al. Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans*. **Caries Res**, Basel, v.25, n.2, p.116-122, Mar./Apr,1991.

EMANUELSSON, I.R.; THORNQVIST, E. Genotypes of mutans streptococci tend to persist in their host for several years. **Caries Res.**, Basel, v.34, n.2, p.133-139, 2000.
FABIO, U. et al. Production of bacteriocin-like substances by human oral streptococci. **Microbiologica**, Pavia, v.10, n.4, p.363-370, Oct. 1987.

FOX, S. **Medical microbiology**. 3.ed. Reading: [s. n.], 1999.

FUJIWARA, T. et al. Biochemical and genetic characterization of serologically untypable *Streptococcus mutans* strains isolated from patients with bacteremia. **Eur. J. Oral Sci.** Copenhagen, v.109, p.330-334, 2001.

GIBBONS, R. J. Microbial ecology. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.63, n.3, p.378-385, Mar. 1984.

GIBBONS, R. J.; VAN HOUTE, J. Dental caries. **Annu. Rev. Med.**, Boston, v.26, p.121-136, 1975.

GOLD, O. C.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *S. mutans*. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.18, p.1356-1364, 1973.

GRÖNROOS, L. **Quantitative and qualitative characterization of mutans streptococci in saliva and in dentition**. 2000. Academic Dissertation. University of Helsinki, Finland. 2000.

GRONRÖÖS, L.; ALALUUSUA, S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. **Caries Res.**, Basel, v.34, p.474-80, 2000.

GRONROOS, L. et al. Chlorhexidine susceptibilities of mutans streptococcal serotypes and ribotypes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Bethesda, v.39, n.4, p.894-898, apr.1995.

GRONROOS, L. et al. Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmission of bacteria from mother to child. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 2595-600, 1998.

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

HALE, J. et al. Bacteriocin (mutacin) production by *Streptococcus mutans* genome sequence reference strain UA159: elucidation of the antimicrobial repertoire by genetic dissection. **Appl. Environ. Microb.**, Washington, v.71, n.11, p.7613-7617, 2005.

HAMADA, S.; KARAMITSU, H. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfC* gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. **Infect. Immun.**, Washington, v.56, p.1999-2005, 1988.

HAMADA, S.; OOSHIMA, T. Inhibitory spectrum of a bacteriocinlike substance (mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.54, n.1, p.140-145, Jan./Fev.1975.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.44, n.2, p.331-384, jun.1980.

HAMADA, S. et. al. Epidemiological survey of *Streptococcus mutans* among Japanese children. Identification and serological typing of the isolated strains. **Jpn. J. Microbiol.** Tokyo, v.20, p.33-44. 1976.

- HILLMAN, J. D. et al. Modification of an effector strain replacement therapy of dental caries to enable clinical safety trials. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.102, n.5, p.1209-19, may. 2007.
- HIROSE, H. et al. Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth-surface caries increment. **Carie Res.**, Basel, v.27, p.292-297, 1993.
- HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994.
- HOMER, K. A.; WHILEY, R. A.; BEIGHTON, D. Proteolytic activity of oral streptococci. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.55, p.257-60, 1990.
- JACKSON, R. J.; LIM, D. V.; DAO, M. L. Identification and analysis of a collagenolytic activity in *Streptococcus mutans*. **Curr. Microbiol.**, New York, v.34, p.49-54, 1997.
- JAKOB, F. et al. Definition de quelques termes relatifs a la lysogénie. **Ann. Inst. Pasteur**, Paris, v.84, p.222-224, 1953.
- KAMIYA, R. U. et al. Frequency of four different mutacin genes in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-free and caries-active individuals. **J. Med. Microbiol.**, London, v.54, pt 6, p.599-604, jun. 2005a.
- KAMIYA, R. U. et al. Mutacin production in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-affected and caries-free individuals. **Oral Microbiol. Immunol.** Copenhagen, v.20, p.20-24, 2005b.
- KEYES, P. H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.1, p.304-20, 1960.
- KLEIN, M., I. et al. Longitudinal study of transmission, diversity and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.42, n.10, p.4620-4626, Oct. 2002.
- KOHLER, B.; ANDREEN, I.; JONSSON, B. The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at 4 years of age. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.3, n.1, p.14-7, mar. 1988.
- KÖHLER, B.; BIRKHED, D.; OLSSON, S. Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. **Caries Res.**, Basel, v.29, p.402-406, 1995.
- KOHLER, B.; BRATTHALL, D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.9, p.584-588, 1979.
- KÖHLER, B.; KRASSE, B. Human strains of mutans streptococci show different cariogenic potential in the hamster model. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.5, n.4, p.177-180, aug. 1990.

KOLENBRANDER P.E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.54, p.413-37, 2000.

KOLENBRANDER, P. E.; ANDERSEN, R. N. Multigeneric aggregations among oral bacteria: a network of independent cell-to-cell interactions. **J. Bacteriol.**, Washington, v.168, n.2, p.851-9, nov.1986.

KOLENBRANDER, P. E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **J. Bacteriol.**, Washington, v.175, p.3247-3252, 1993.

KOZAI, K. et al. Changes in strains of mutans streptococci induced by treatment with chlorhexidine varnish. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.70, n.9, p.1252-7, Sep. 1991.

KRETH, J. et al. Cell density-and ComE-dependent expression of group of mutacin and mutacin-lik genes in *Streptococcus mutans*. **FEMS Microb. Lett.**, Amsterdam, v.265, n.1, p.11-7. dec. 2006.

KREULEN, C. M. et al. *Streptococcus mutans* in children using nursing bottles. **ASDC J. Dent. Child**, Chicago, v.64, p.107-11, 1997.

KULKARNI, G. V.; CHAN, K. H.; SANDHAM, H. J. An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of mutans streptococci. **J. Dent. Res.**, Washington, v.68, n.7, p.1155-61, jul. 1989.

LANCEFIELD, R. C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. **J. Exp. Med.**, New York, v.57, p.571, 1933.

LEMBO, F. L. et al. Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.22, n.5, p.313–319, 2007.

LI, Y. H. et al. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. **J. Bacteriol.**, Washington, v.183, p.897-908, 2001.

LI, Y.; CAUFIELD, P. W. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. **Oral Microbiol Immunol.**, Copenhagen, v.13, p.17-22, 1998.

LINDQUIST, B.; EMILSON, C. G. Dental location of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human harboring both species. **Caries Res.**, Basel, v.25, n.2, p.146-152, mar-apr. 1991.

LINZER, R.; REDDY, M. S.; LEVINE, M. J. Immunochemical aspects of sorotype carbohydrate antigens of *Streptococcus mutans*. In: HAMADA, S.; MICHALEK, S. M.; KIYONO, H.; MANAKER, L.; MCGHEE, J. R. (Eds.) **Molecular microbiology and immunology of *Streptococcus mutans***. Amsterdam: Elsevier, 1986. p.29-38.

LOESCHE, W. L. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.50, n.4, p.353-380, Dec. 1986.

LOESCHE, W. L.; GRENIER, E. Detection of *Streptococcus mutans* in plaque samples by the direct fluorescent antibody test. **J. Dent. Res.**, Washington, v.55, p.87A-93A, 1976.

LOESCHE, W. J. et al. Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. **Infect. Immun.**, v. 11, p. 1252-1260, 1975.

LONGO, P. L.; MATTOS-GRANER, R. O.; MAYER, M. P. Determination of mutacin activity and detection of mutA genes in *Streptococcus mutans* genotypes from caries-free and caries-active children. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.18, n.3, p.144-9, Jun. 2003.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Host parasite relationship. In: MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. (Eds). **Brock biology of microorganisms**. New Jersey: Prentice Hall, 1997. p.785-812.

MAIDEN, M. C. et al. Identification of meningococcal serosubtypes by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.30, n.11, p.2835-2841, 1992.

MARSH, P. D. Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque. **Proc. Finn. Dent. Soc.**, Helsinki, v.87, n.4, p.515-525, 1991.

MASUDA, N. et al. Longitudinal survey of the distribution of various serotypes of *Streptococcus mutans* in infants **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.10, n.4, p.497-502, Oct.1979.

MATTOS-GRANER, R. O. et al. Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-year-old Brazilian children. **Caries Res.**, Basel, v.32, n.5, p.319-323, Sep-Oct. 1998b.

MATTOS-GRANER, R. O. et al. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.79, n.6, p.1371-7, Jun. 2000.

MATTOS-GRANER, R. O. et al. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. **Infect. Immun.**, Washington, v.69, p.6931-6941, 2001a.

MATTOS-GRANER, R. O. et al. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.39, p.2313-2316, 2001b.

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

NAKANO, K. et al. T. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, *k*, in the human oral cavity. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.42, p.198- 202, 2004a.

_____. Development of a PCR method for rapid identification of new *Streptococcus mutans* serotype k strains. **J. Clin. Microbiol.** Washington, v.42, p.4925-4930, 2004b.

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

NAPIMOGA, M. H. et al. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. **J. Oral Science**, Tokyo, v.47, n.2, p.59-64, 2005.

NEWBRUN, E. **Cariologia**. 2.ed. São Paulo: Ed. Santos, 1988.

NICOLAS, G. et al. Mutacin H-29B is identical to mutacin II(J-T8). **BMC Microbiol.**, London, v.6, p.36, 2006.

NOVAK, J.; CAUFIELD, P. W.; MILLER, E. J. Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from *S. mutans*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.176, p.4316-4320, 1994.

NYVAD, B. Microbial colonization of human tooth surfaces. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, Copenhagen, v.101, p.7-45, 1993.

OLD, L. A.; LOWES, S.; RUSSEL, R. R. B. Genomic variation in *Streptococcus mutans*: deletions affecting the multiple pathways of B-glucoside metabolism. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.21, p.21-27, 2006.

OOSHIMA, T. et al. Contributions of three glucosyltransferase to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res.** Chicago, v.80, p.1672-1677, 2001.

OHO, T. et al. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 15, n. 4, p. 258-62, aug. 2000.

OZAKI, K. et al. A novel mechanism for glucose side-chain formation in rhamnose-glucose polysaccharide synthesis. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 532, n.1-2, p.159-63, Dec. 2002.

PARKER, M. T.; BALL, L. C. Streptococci and aerococci associated with systemic infection in man. **J. Med. Microbiol.**, Reading, v.9, n.3, p.275-302, 1976.

PASTER, B. J. et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **J. Bacteriol.**, Washington, v.183, p.3770-3783, 2001.

PERCH, B.; KJEMS E.; RAVN T. Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 82, p. 457-370, 1974.

PRITCHARD, D. G. et al. Biochemical aspects of serotype carbohydrate antigens of *Streptococcus mutans*. In: HAMADA, S.; MICHALEK, S. M.; KIYONO, H.;

MANAKER, L.; MCGHEE, J. R. (Eds.) **Molecular microbiology and immunology of *Streptococcus mutans***. Amsterdam: Elsevier, 1986.

QI, F.; CHEN, P.; CAUFIELD, P. W. Purification of mutacin III from group III *Streptococcus mutans* UA787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.65, n.9, p.3880-3887, Sep. 1999.

_____. Purification and biochemical characterization of mutacin I from the group I strain of *Streptococcus mutans*, CH43, and genetic analysis of mutacin I biosynthesis genes. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.66, n.8, p.3221-9, Aug. 2000.

_____. The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and a nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.67, n.1, p.15-21, Jan. 2001.

REDMO EMANUELSSON, I. -M.; LI, Y.; BRATTHALL, D. Genotyping shows different strains of mutans streptococci between father and child and within parental pairs in Swedish families. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.13, p.271-277, Oct.1998.

REDMO EMANUELSSON, I.-M. et al. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Oral Microbiol. Immunol.** Copenhagen, v.18, n.1, p.24-29, 2003.

REEDER, J. C.; WESTWELL, A. J.; HUTCHINSON, D. N. Indifferent streptococci in normal and purulent eyes of neonates. **J. Clin. Pathol.**, London, v.38, n.8, p.942-945, 1985.

ROBSON, C. L. et al. Isolation and partial characterization of the *Streptococcus mutans* type All lantibiotic mutacin K8. **Microb.**, Reading, v.153, n.5, p.1631-41, May. 2007.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Setauket, NY: Exeter software, 2000.

SAARELA, M. et al. Genetic diversity within isolates of mutans streptococci recognized by an rRNA gene probe. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 3, p. 584-7, Mar. 1993 a.

SAARELA, M. et al. Transmission of oral bacterial species between spouses. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 8, n. 6, p. 349-54, Dec. 1993 b.

SAARELA, M. et al. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Arch. Oral Biol.**, Elmsford, v.41, n.8-9, p.821-6, Aug./Sept.1996.

SCHROEDER, V. A.; MICHALEK, S. M.; MACRINA, F. L. Biochemical characterization and evaluation of virulence of a fructosyltransferase-deficient mutant of *Streptococcus mutans* V403. **Infect. Immun.**, Washington, v.57, n.11, p.3560-3569, Nov. 1989.

SEOW, W. K. Biological mechanisms of early childhood caries. **Comm. Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v.26, suppl.1, p.8-27, 1998.

SHIBATA, Y. et al. Analysis of loci required for determination of serotype antigenicity in *Streptococcus mutans* and its clinical utilization. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.41, n.9, p.4107-12, Sep. 2003.

SMITH, D. J. et al. Antigenicity and immunogenicity of a synthetic peptide derived from a glucan-binding domain of mutans streptococcal glucosyltransferase. **Infect. Immun.**, Washington, v.61, p.2899-2905, 1993.

SOCRANSKY S. S. et al. Association between microbial species in subgingival plaque samples. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 3, n. 1, p. 1-7, mar, 1988

TAO, L.; TANZER, J. M.; MACALISTER, T. J. Bicarbonate and potassium regulation of the shape of *Streptococcus mutans* NCTC 10449S. **J. Bacteriol.**, Washington, v.169, p. 2543-2547, 1987.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTUM, F. Microbiologia, 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999.
TSUKIOKA, Y. et al. Identification of a fourth gene involved in dTDP-rhamnose synthesis in *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.179, n.13, p.4411-4, July 1997.

TSUMORI, H.; KURAMITSU, H. K. The role of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases in the sucrose-dependent attachment to smooth surfaces: essential role of the Gtf C enzyme. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.12, p.274-280, 1997.

VAN HOUTE, J. et al. Mutans streptococci and non-mutans streptococci acidogenic at low pH, and *in vitro* acidogenic potencial of dental plaque in two different areas of the human dentition. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 70, n. 12, p. 1503-1507, Dec. 1991.

VAN HOUTE, J.; LOPMAN, J.; KENT, R. The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.75, p.1008-1014, 1996.

WHILEY, R. A.; BEIGHTON, D. Current classification of the oral streptococci. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.13, n.4, p.195-216, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Oral health surveys, basic methods**. 4th ed. Geneva, OMS, 1997. p.66.

YAMASHITA, Y. et al. Role of the *Streptococcus mutans* gtf genes in caries induction on the specific-pathogen-free rat model. **Infect. Immun.**, Washington, v.61, n.9, p.3811-3817, Sept. 1993.

YAMASHITA, Y. et al. Genes involved in cell wall localization and side chain formation of rhamnose-glucose polysaccharide in *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 180, n. 21, p. 5803-5807, 1998a.

YAMASHITA, Y. et al. Biological functions of UDP-glucose synthesis in *Streptococcus mutans*. **Microb.**, Reading, v.144, pt 5, p.1235-45, May. 1998b.

ANEXO 1**APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**