UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CASSIA MARIA FISCHER RUBIRA

**Estudo longitudinal sobre similaridade, transmissão,
e estabilidade de colonização de *Streptococcus*
mutans em famílias brasileiras**

BAURU
2007

CASSIA MARIA FISCHER RUBIRA

**Estudo longitudinal sobre similaridade, transmissão,
e estabilidade de colonização de *Streptococcus*
mutans em famílias brasileiras**

v.1

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Estomatologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Odila Pereira da Silva Rosa

Co-Orientador: Prof. Dr. Walter A. Bretz

BAURU
2007

Rubira, Cassia Maria Fischer

R825e Estudo longitudinal sobre similaridade, transmissão, e estabilidade de colonização de *Streptococcus mutans* em famílias brasileiras / Cassia Maria Fischer Rubira.-- Bauru, 2007.
112 p.

Tese. (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profª Drª Odila Pereira da Silva Rosa
Co-Orientador: Prof Dr Walter A. Bretz

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Comitê de Ética: Forsyth Institute IRB (Boston, MA, USA)
Protocolo nº: 6-11
Data: August 7, 2007

DEDICATÓRIA

À minha filha, Isabella, pela compreensão e ajuda. Aos meus pais, Gabriel e Myrthes que sempre me incentivaram para estudar, aos quais devo, em grande parte, o que hoje sou. Às minhas irmãs, Izabel e Cecília, pelas palavras positivas. Aos meus sobrinhos, Pedro, Miguel, Juliana e Eduardo. À minha avó Izabel. Ao José Augusto. Ao Wilson. Enfim, as pessoas que por mim, depositaram sua confiança.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof Dra Odila Pereira da Silva Rosa, pela confiança e a certeza de que eu não a decepcionaria. Ao Prof Dr Walter Bretz, pela confiança em dobro, a minha eterna gratidão. Aos meus dois orientadores, espero ter cumprido parte de um belíssimo trabalho realizado no Projeto Pittsburgh.

À todos os meus professores desta casa e do curso de doutorado em Estomatologia, que contribuíram na minha formação como pesquisadora e educadora. Em especial, ao Prof Dr José Humberto Damante pela amizade e paciência, à Prof^a Dr^a Ana Lucia Álvares Capellozza pela alegria e o carinho, ao Prof Dr Luiz Eduardo Montenegro Chinellato pela atenção e a serenidade, aos três meus sinceros agradecimentos e eterna gratidão.

Aos demais professores da Cirurgia e da Estomatologia: Profs. Drs. Paulo Sérgio Perri de Carvalho, Eduardo Sant'Ana, Osny Ferreira Júnior, Júlio de Araújo Gurgel.

À Profa Dra Maria Fidela de Lima Navarro e ao Prof. Dr. José Carlos Pereira pelo apoio.

Ao Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris pelas inúmeras orientações quanto à análise estatística.

Aos funcionários da Estomatologia e da Cirurgia, Josieli, Elza, Luciana, Camila, Fernanda, Roberto, Roque e Walderez. Em especial à Marília Gião, minha companheira.

I also thank Dr Anne Tanner and my Forsyth's friends, Eleni, Jennifer, Charles, Mohamed and Lila.

Aos amigos de turma de Doutorado, Luís Fernando, Eduardo, Flávio, Cláudio e Fernando. Aos colegas de Pós-Graduação, Renato, Marcelo, Etiene, Carla, Zanda, Melissa, Josiane, Tadeu, Renata, Daniele, Gustavo, Letícia, Marta, Ellen, Manoela, Camila, Marcelo, Gabriel, Ana Raquel, Adilson, Angélica e o Augusto.

À secretaria de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru. Aos funcionários do Serviço de Biblioteca e Documentação "Prof Dr Antônio Gabriel Atta".

“For all those times you stood by me
For all the truth that you made me see
For all the joy you brought to my life
For all the wrong that you made right
For every dream you made come true
For all the love I found in you
I'll be forever thankful”

Diane Warren

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar longitudinalmente a transmissão de *Streptococcus mutans* em um grupo de famílias brasileiras de baixa renda. Um critério de inclusão importante foi o de todos os adultos conviverem na mesma casa com a criança. Participaram da pesquisa 14 mães, pais e crianças e 8 avós. Amostras de saliva das crianças foram coletadas em quatro visitas durante 22 meses, para pesquisa de *S.mutans*. Foram positivas apenas 8 crianças, que tiveram os seus isolados e os isolados de suas famílias identificados pelo método de hibridização DNA-DNA. Um total de 506 isolados de *S.mutans* foi genotipado pelo método de AP-PCR, usando o *primer* OPA-02. Foram detectados 20 genótipos diferentes nas 8 famílias, variando de 1 a 5 nos adultos e 1-2 nas crianças. Todas as mães e alguns pais e avós compartilharam genótipos com as crianças. Em todas as famílias foram encontrados genótipos homólogos nos adultos. Alguns genótipos foram estáveis, e outros, se perderam, mas o compartilhamento pode favorecer a contínua reinfecção. Três crianças desenvolveram cárie no período. O encontro de genótipos de cada membro da família na criança e o compartilhar de genótipos nos adultos, sugerem uma reavaliação de modelos preventivos antimicrobianos focalizados apenas na figura materna.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*; AP-PCR; Transmissão

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate in a longitudinal study the transmission of *Streptococcus mutans* in Brazilian families of a low socioeconomic status. An important entry criterion for the study was to include all members of a household in the study. The study cohort was comprised of 14 mothers, fathers and children and 8 grandmothers. Saliva samples were collected for *S. mutans* analysis in 4 visits during 22 months. Only eight children were positive for *S. mutans* by employing DNA-DNA hybridization that was also applied to household members. A total of 506 isolates of *S. mutans* were genotyped by AP-PCR with the *primer* OPA-02. Twenty genotypes were detected in 8 families ranging from 1 to 5 in the adults and 1-2 in the children. All mothers and some fathers and grandmothers shared similar genotypes with the children. In all families homologous genotypes were encountered among adults. Some genotypes were stable, and others were lost although sharing a similar environment may favor additional transmission episodes. Three children developed decay during the study period. The fact that children shared genotypes from all household members suggest that reevaluation of preventive methods aimed at suppressing *S. mutans* infections should include additional family members and not only the mothers.

Key words: *Streptococcus mutans*; AP-PCR; Transmission

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Ciclos do termociclador, programado segundo SAARELA et al 1996 46
- Figura 2 – Exemplo de um *Checkerboard* usado para detectar 8 espécies bacterianas em isolados de algumas crianças. As linhas verticais contêm as sondas das espécies indicadas abaixo na figura. As linhas horizontais possuem as amostras dos isolados das crianças. As duas últimas linhas horizontais estão os controles padrões 10^5 e 10^6 UFC/ml 55
- Figura 3 – Fotografia do gel de agarose, onde os produtos de reação de amplificação com o iniciador arbitrário de isolados de *S.mutans* da família 2 foram submetidos à corrida eletroforética. Linha 1 – peso molecular (M) utilizado foi DNA 1 kpb; linhas 1 a 7 – isolados da criança (linhas 2 e 3, V2; linhas 4 e 5, V3; linhas 6 e 7, V4); linhas 8 a 11 – isolados da mãe (linha 8, V1; linha 9, V2; linhas 10 e 11, V4); linhas 12 a 15 – isolados do pai (linhas 12 e 13, V1; linhas 14 e 15, V2); Linhas 16 a 19 – isolados da agregada (linhas 16 e 17, V1; linhas 18 e 19, V2) 57
- Figura 4 – Transmissão intrafamiliar indicado pela similaridade dos genótipos da Tabela 8 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas e escores de EM das 14 Famílias	50
Tabela 2 – Médias e desvios-padrão das características clínicas e escores de EM dos adultos das 14 famílias	51
Tabela 3 – Número de dentes irrompidos, ceos e escores de EM nas 14 crianças	52
Tabela 4 – Correlação entre o número de dentes e o momento de detecção (MD) inicial de EM pelo teste de Spearman*	52
Tabela 5 – Comparação dos índices CPOS e escores de EM dos pais de crianças com e sem cárie pelo teste de Mann Whitney*	53
Tabela 6 – Hábitos de risco (n=4) dos adultos das famílias de crianças com e sem cárie	54
Tabela 7 – Total de isolados de <i>Streptococcus .mutans</i> genotipados nos membros das 8 famílias	56
Tabela 8 – Distribuição dos genótipos dos <i>Streptococcus mutans</i> identificados durante as visitas	58
Tabela 9 – Estabilidade dos genótipos nos membros das 7 famílias	59
Tabela 10 – Transmissão dos genótipos das 7 famílias	60
Tabela 11 – Encontro de genótipos em um ou associação de membros das 8 famílias	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-PCR – Arbitrarily primed Polymerase Chain Reaction (Arbitrarily primed Polymerase Chain Reaction)

BHI - Brain Heart Infusion

Checkerboard DNA-DNA Hybridization – Painel de hibridização DNA-DNA

CPOS – número de superfícies cariadas, perdidas e obturadas nos dentes

DNA *Fingerprinting* – Impressão Digital Genômica do DNA

EM – *Streptococcus* mutans

IG – índice gengival

L - *Lactobacillus*

RAPD – Random amplification of polymorphic DNA (Polimorfismo no comprimento de DNA amplificado ao acaso)

p – nível de significância

pb – pares de base

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia de Polimerase)

Primer – oligonucleotídeos

REA – restriction enzyme analysis (Análise com enzimas de restrição)

RFLP – Restriction fragment length polymorphism (Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do DNA)

r.p.m – rotações por minuto

SB-20 – Agar sacarose bacitracina

UFC – unidade formadora de colônia

UPGMA – unweighted pair-group method using arithmetic averages (análise das medias aritméticas de grupos não-ponderados)

LISTA DE SÍMBOLOS

cm - centímetros

μl - microlitro

ml – mililitro

mg - micrograma

ng - nanograma

mM - milimolar

μg/M - micro

± - desvio-padrão

U/ml – Unidade por mililitro

°.C – grau Celsius

pH - potencial hidrogeniônico'

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	REVISÃO DA LITERATURA	29
3	PROPOSIÇÃO	38
	MATERIAL E MÉTODOS	
	4.1 População	40
	4.2 Exame clínico e Questionário	41
4	4.3 Exame bacteriológico e isolamento de EM da saliva	41
	4.4 Identificação dos estreptococos mutans	42
	4.5 Genotipagem dos <i>Streptococcus mutans</i> por AP-PCR	44
	4.6 Análise Estatística	47
	RESULTADOS	
5	5.1 Dados clínicos e quantificações de EM	49
	5.2 Identificação e genotipagem dos estreptococos mutans	55
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
	ANEXO 1	85
	ANEXO 2	93
	ANEXO 3	105

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os estreptococos mutans (EM) constituem um grupo de cocos Gram positivos bioquímica, antigenica e geneticamente heterogêneo, do qual fazem parte, entre outros, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, os principais responsáveis pela cárie dental humana (LOESCHE, 1986).

O requisito básico para a aquisição e estabelecimento desses microrganismos é a irrupção dos primeiros dentes decíduos, uma vez que necessitam de superfícies não descamativas para se implantar (BERKOWITZ, JORDAN, WHITE, 1975; CARLSSON, GRAHNEN, JONSSON, 1975), tendo sido observado que, quanto mais precocemente ocorrer a colonização oral por EM, maior o risco de desenvolvimento de cárie na dentição decídua (ALALUUSUA, RENKONEN, 1983; KOHLER et al., 1988; FUJIWARA et al., 1991). Por essa razão existe uma preocupação quanto ao momento da aquisição inicial e a fonte desses microrganismos.

A colonização pelos EM ocorre num período definido por CAUFIELD et al. (1993) como “janela da infectividade”, dos 19 aos 31 meses de vida. Esse período pode variar, conforme o autor, sendo mais precoce (MATTOS-GRANER et al., 1998; KLEIN et al., 2004), ou mais tardio (EMANUELSSON, LI, BRATTHALL, 1998). REDMO EMANUELSSON, THORNQVIST, 2001 sugeriram que a criança que não for colonizada até os três anos pode permanecer livre por anos.

A mãe parece ser a principal fonte de EM para a infecção dos filhos, pois na maioria das vezes é sua principal cuidadora (BERKOWITZ, JONES, 1975; LI, CAUFIELD, 1995; ALALUUSUA et al., 1996; EMANUELSSON, LI, BRATTHALL, 1998; REDMO EMANUELSSON, WANG, 1998). Dados experimentais já demonstraram que mães com altas concentrações de EM salivares tendem a ter crianças altamente infectadas, ocorrendo o inverso com mães com baixas concentrações (KOHLER, BRATTHALL, 1978; KOHLER, BRATTHALL, KRASSE,

1983; CAUFIELD, CUTTER, DASANAYAKE, 1993). Essas observações tornaram-se a base de estudos que buscam interferir com a transmissão de EM de mãe para filho diminuindo os níveis salivares de EM nas mães (KOHLETER et al., 1982; KOHLER, BRATTHALL, KRASSE, 1983; TENOVUO et al., 1992; CAUFIELD, CUTTER, DASANAYAKE, 1993; KOHLER, ANDRÉEN, 1994). Entretanto, existem outras fontes de infecção (BERKOWITZ et al., 1975; 1980; CAUFIELD, WALKER, 1989; CAUFIELD, CUTTER, DASANAYAKE, 1993; LI, CAUFIELD, 1993; REDMO EMANUELSSON, WANG, 1998; SPOLIDORIO et al., 1993; KLEIN et al., 2004; ERSIN et al., 2004; HAMES-KOCABAS et al., 2006).

Para identificar corretamente a fonte de infecção e o efeito de medidas preventivas, é preciso saber reconhecer o *S.mutans* que se pretende eliminar. Nessa tarefa foram usados vários métodos, como testes bioquímicos, bacteriocinotipagem e sorotipagem (MASUDA et al., 1979), mas as modernas técnicas moleculares aprimoraram a identificação e quantificação dos microrganismos, permitindo aos pesquisadores melhor compreensão sobre a composição da microbiota bucal (SOCRANSKY et al., 2004). A técnica de hibridização DNA-DNA, por exemplo, permite a determinação simultânea da presença e da quantidade de espécies bacterianas em amostras clínicas múltiplas ou únicas (SIQUEIRA et al., 2001). Uma técnica que vem sendo largamente utilizada na identificação é a AP-PCR, reação em cadeia da polimerase com primers arbitrários. Trata-se de técnica relativamente fácil e rápida de executar, comparada à técnicas mais elaboradas para as quais é necessário o conhecimento prévio da sequência de DNA da bactéria alvo (SAARELA et al., 1996).

No Brasil, AZEVEDO, ZELANTE (1994), usando bacteriocinotipagem, e SPOLIDORIO et al. (2003), com AP-PCR, realizaram estudos transversais com famílias, tendo observado o compartilhamento de genótipos homólogos de crianças e seus familiares. Estudo longitudinal completo, pesquisando similaridade, estabilidade e diversidade genotípica, foi realizado por KLEIN et al. (2004), em pares de mães e filhos que ficavam em creches. Pela importância do tema, no que diz respeito a medidas preventivas, são necessárias informações longitudinais adicionais sobre a aquisição, estabilidade e compartilhamento de genótipos, em famílias de baixa renda cujos primogênitos sejam cuidados em casa, no período de aquisição inicial.

2. Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

O início e desenvolvimento da cárie dental dependem da quantidade e qualidade do biofilme, presença de carboidratos (composição, frequência e quantidade) e da resistência da superfície do dente à adesão dos EM. O aumento do nível de EM e lactobacilos está intimamente associado à ingestão de carboidratos, pois como organismos acidúricos, sobrevivem ao aumento da acidez na placa quando comparados aos demais organismos menos ácido-resistentes. Conseqüentemente à elevação do número de EM e lactobacilos, aumenta a probabilidade de infecção dos dentes vizinhos, especialmente em presença de sacarose, que favorece a adesão inicial dos EM à superfície dos dentes (VAN HOUTE, 1993). Outros fatores como a saliva, exposição ao flúor, higiene bucal, idade, influência familiar, condição sócio-econômica e susceptibilidade do indivíduo são coadjuvantes no desenvolvimento da cárie, podendo modular a qualidade e quantidade do biofilme e aumentar ou diminuir a resistência das estruturas dentais (LOESCHE, 1986; ALALUUSUA et al., 1994).

Os EM constituem um grupo heterogêneo de microrganismos classificados em 7 espécies e 8 sorotipos: *S. cricetus* (sorotipo a), *S. mutans* (sorotipos c, e, f), *S. sobrinus* (sorotipos d, g), *S. macacae* (sorotipo c), *S. downei* (sorotipo h) e *S. ferus* (sorotipo c). O sorotipo k foi identificado mais recentemente (NAKANO et al., 2004) e parece sobreviver mais tempo na circulação sanguínea humana. No homem, os EM prevalentes são os *Streptococcus mutans*, com o sorotipo c correspondendo de 70 a 100% dos isolados, seguidos do *Streptococcus sobrinus* (LOESCHE, 1986).

A infância é um importante período para o futuro da saúde bucal no indivíduo, daí o interesse em determinar o momento, o estabelecimento e a fonte de transmissão dos EM na boca. Durante este período os dentes decíduos irrompem e os microorganismos os colonizam. No primeiro ano de vida, os EM podem ser ou

não detectados ou estar provisoriamente presentes na boca de infantes (CARLSSON et al., 1970; 1975; BERKOWITZ et al., 1975; 1980; MASUDA et al., 1979; ALALUUSUA, RENKONEN, 1983; FUJIWARA et al., 1991). Inicialmente, as crianças abrigam baixos níveis de EM no biofilme e a colonização é transitória (MASUDA et al., 1979; DAVEY, ROGERS, 1984; ALALUUSUA et al., 1996).

O período de aquisição dos EM é um dos fatores chave para melhor entendimento da evolução e do desenvolvimento do processo da cárie, pois quanto mais precocemente a criança for por eles colonizada, maior a chance de desenvolvimento da doença (KOHLEK et al., 1978; 1988; ALALUUSUA, RENKONEN, 1983). Contudo, os limites do período de aquisição continuam indefinidos, em face das diferenças reais entre populações ou métodos de amostragem e de detecção. MASUDA et al. (1979) sugerem que o período de aquisição inicial ocorra entre os 13 e os 31 meses de idade da criança. CAUFIELD, CUTTER, DASANAYAKE, em 1993, criaram a hipótese da “Janela de Infectividade” para EM, segundo a qual a aquisição tem lugar entre os 19 e 31 meses de idade. KARN et al. (1998) apontam o período dos 8 aos 15 meses, enquanto TEDJOSASONGKO, KOZAI (2002) relatam uma variação maior no período de aquisição, dos 8 aos 52 meses. Em média, a aquisição inicial é observada aos 26 meses e pelo menos nos primeiros 5 anos de vida (CAUFIELD, CUTTER, DASANAYAKE, 1993; LI, CAUFIELD, 1995). Em crianças brasileiras, a aquisição inicial ocorre mais precocemente, aos $15,4 \pm 2,12$ meses para *S. mutans*, e $17,63 \pm 3,56$ meses para *S. sobrinus* (KLEIN et al., 2004).

A detecção de EM aumenta com a idade e com o número de dentes e áreas retentivas em suas superfícies (CARLSSON et al., 1975; MASUDA et al., 1979; ALALUUSUA, RENKONEN, 1983; KLEIN et al., 2004). A presença de superfícies não-descamativas parece ser essencial para a colonização (CARLSSON et al., 1969; 1970; BERKOWITZ, JORDAN, WHITE, 1975; BERKOWITZ, TURNER, GREEN 1980). Entretanto, há evidências de que os EM podem ser encontrados antes da erupção dos dentes (MILGROM et al., 2000). TANNER et al. (2002) detectaram EM na língua de 33 % de bebês edêntulos, com forte relação com a presença da espécie no adulto.

Conforme demonstrado por KOHLER et al. (1978; 1988), a transmissão de EM se dá através de objetos contaminados por saliva. Em seu estudo, a infecção ocorreu pelo compartilhamento de utensílios como copo, colher que o adulto,

principalmente a mãe, levava à boca, em questão de horas. Daí a conclusão de que a fonte natural para a infecção da criança é o indivíduo com quem tem mais contato. Os autores demonstraram também que a chance da criança se infectar é baixa quando o cuidador principal (mãe ou outro) abrigar nível inferior a 100.000 *S.mutans*/ml na saliva.

VAN HOUTE, GREEN (1974) sugeriram que a transmissão de bactérias entre indivíduos deve-se essencialmente a fatores de afinidade bacteriana e ao número de UFC (unidades formadoras de colônias) disponíveis para a aderência, o que inclui, por exemplo, a frequência de transferência, fatores do hospedeiro que interferem na aderência ou crescimento bacteriano, sobrevivência bacteriana durante a transferência, e tipo de dieta do hospedeiro. Esses fatores, biológicos, bem como os relacionados a hábitos e estilo de vida podem ser diferentes em diferentes populações e países.

A identificação individual das cepas de EM isoladas das crianças é essencial para determinar a fonte de infecção. Para tanto, a comparação entre cepas de crianças e conviventes tem sido realizada com base em características fenotípicas, usando métodos como a bacteriocinotipagem (BERKOWITZ, JORDAN, WHITE, 1975; MASUDA et al., 1979; DAVEY, ROGERS, 1984; AZEVEDO, ZELANTE, 1994; GRONROOS et al., 1998) e a sorotipagem (BERKOWITZ et al., 1975; MASUDA et al., 1979; LI et al., 2001), bem como em características genotípicas, investigadas através da determinação de plasmídios em EM (CAUFIELD et al., 1988), ou de técnicas que analisam os modelos das bandas de digeridos do DNA cromossômico por endonucleases de restrição, ou impressão digital de DNA cromossômico - CDF (*chromosomal DNA fingerprinting*) (CAUFIELD, WALKER, 1989; KULKARNI, CHAN, SANDHAM, 1989; LI, CAUFIELD, 1995; 1998; REDMO EMANUELSSON, WANG, 1998; EMANUELSSON, LI, BRATTHALL, 1998; KOZAI et al., 1999; EMANUELSSON, THORNQUIST, 2001; TEDJOSONGKO, KOZAI, 2002; LINDQUIST, EMILSON, 2004); ou estudam o polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição - RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) (MATTOS-GRANER et al. 2001); ou fazem a ribotipagem (SAARELA et al., 1993; ALALUUSUA et al., 1994; 1996; GRONROOS et al., 1998), ou ainda, a reação em cadeia da polimerase com iniciadores ("*primers*") arbitrários – AP-PCR (*arbitrarily primed-polymerase chain reaction*) (SAARELA et al., 1996; LI, CAUFIELD, 1998; LI et al., 2001; SPOLIDORIO et al., 2003; ERSIN et al., 2004;

KLEIN et al., 2004, LI et al., 2005). Sem dúvida, os métodos baseados nas características genotípicas são mais acurados.

Dentre as técnicas de genotipagem, destaca-se a AP-PCR. Trata-se de um método rápido, com economia de tempo e de recursos laboratoriais, que pode ser usado na identificação genômica polimórfica nos estudos epidemiológicos e taxonômicos (WELSH, MACCLELLAND, 1990; LI, CAUFIELD, 1998). Na comparação entre técnicas, os resultados da AP-PCR correlacionaram-se bem com a ribotipagem, indicando tratar-se de método adequado quando se investiga grande número de isolados de EM (SAARELA et al., 1996).

LI; CAUFIELD (1998) também encontraram excelente concordância entre o *fingerprinting* de DNA cromossômico e AP-PCR. No estudo de 14 isolados de *S.mutans* por AP-PCR e *fingerprinting* de DNA cromossômico, esta última mostrou maior capacidade de distinção entre os padrões genotípicos do que técnica de AP-PCR, mas o nível de discriminação desta comparou-se favoravelmente com o *fingerprinting* de DNA. Na avaliação da similaridade intrafamiliar, a técnica de AP-PCR apresentou resultado semelhante ao do *fingerprinting* de DNA, quando da comparação dos isolados de 5 pares de mãe-filho com padrões genotípicos idênticos, 5 pares mãe-filho com padrões não idênticos e de 5 pais, demonstrando que a AP-PCR pode distinguir homogeneidade e heterogeneidade de genótipos de EM em famílias. Na comparação entre as duas técnicas, o alto valor de *kappa* ($\kappa=0.867$, $p<0,001$) indicou excelente concordância entre ambas. Quanto à reprodutibilidade, a AP-PCR demonstrou ser uma técnica precisa, com bom desempenho. Em poucos casos a AP-PCR pareceu menos capaz que o *fingerprinting* em discriminar 40 cepas de *S.mutans*. Por essa razão, os autores sugerem, em casos de aparente homologia usando AP-PCR, confirmá-la com um segundo *primer* ou pelo *fingerprinting* de DNA cromossômico.

De 40 *primers* estudados na AP-PCR, o *primer* OPA-02 (OPERON Technologies Inc.), com 10 nucleotídeos – 5'-TGCCGAGCTG e 70% de bases G+C foi o que exibiu o maior potencial discriminador para *S.mutans* (LI, CAUFIELD, 1998). A capacidade da AP-PCR com OPA-02 diferenciar *S.mutans* de *S.sobrinus* foi comparável à do CDF (LI et al., 2001). SAARELA et al. (1996) empregaram o *primer* OPA-05, na AP-PCR para *S.mutans*, e o OPA-13, para o *S.sobrinus*. De modo geral, os autores que estudam similaridade empregam um *primer*, como o OPA-02 (LI et al., 2005), o OPA-05 (ERSIN et al., 2004), o OPA-13 (SPOLIDORIO et al., 2003), ou

dois primers, como o OPA-02 e OPA-13 (KLEIN et al., 2004). No Brasil, estudo transversal com 22 famílias e outro longitudinal, com 16 pares de mães e filhos, confirmaram que a AP-PCR é um método altamente eficiente para diferenciar clones de *S.mutans* nas famílias (SPOLIDORIO et al., 2003), bem como para estudar a transmissão vertical, diversidade genotípica e a estabilidade dos genótipos em crianças de creche, acompanhadas por 20 meses, e suas mães (KLEIN et al., 2004).

Independentemente do método, as pesquisas apontaram as mães como principal fonte de infecção por EM para os filhos, levando alguns autores a sugerir que o atraso da infecção inicial delas originadas seria importante para a prevenção da cárie nas crianças (ALALUUSUA, RENKONEN, 1983; KOHLER et al., 1983). No entanto, quando se pesquisa a porcentagem de pares de mães e filhos que compartilham genótipos observa-se grande variação entre os autores, encontrando-se desde altas porcentagens, em autores como LI, CAUFIELD, 1995; KLEIN et al., 2004 e ERSIN et al., 2004, até baixas porcentagens, conforme EMANUELSSON, LI, BRATTHALL, 1998, e KOZAI et al., 1999 e, em decorrência, conclusões contraditórias. Assim, LI, CAUFIELD (1995), por exemplo, observaram relação entre o desenvolvimento de cárie e a similaridade dos *S.mutans* de mães e filhos quanto ao gênero e a raça, com maior fidelidade de transmissão de mãe para filha (88%) do que de mãe para filho (53%). Entretanto, os meninos com genótipos idênticos aos maternos tiveram 13 vezes maior probabilidade de desenvolver cárie aos 3 anos do que as meninas. Outros autores, porém, não detectaram influência significativa do gênero das crianças sobre a fidelidade de transmissão (LI et al., 2000). Portanto, a abrangência das medidas preventivas pode ir além da intervenção apenas nas mães.

CAUFIELD (1997) observaram que crianças amamentadas no peito adquirem EM com fidelidade significativamente maior que aquelas não amamentadas dessa forma. Discutem que as crianças amamentadas no peito têm uma interação mais intensa com suas mães, favorecendo a transferência das bactérias orais. Mas, que, além disso, o leite materno contém imunoglobulinas que podem desempenhar um papel em orientar quais bactérias indígenas podem colonizar. Junto com os fatores imunológicos transferidos pela placenta, pode ser que esses fatores desempenhem um papel para levar o bebê a selecionar preferencialmente aqueles microrganismos indígenas vindos da mãe, enquanto exclui aqueles vindos do pai e de outras fontes.

Embora a homologia dos genótipos de *S.mutans* seja mais comum entre mães e filhos, os pais e indivíduos estranhos à família podem ser fonte importante de transmissão (EMANUELSSON, THORNQUIST, 2001), mas não existe um modelo válido para todas as famílias ou populações. Há relatos tanto de isolados semelhantes entre pais e filhos na China (REDMO EMANUELSSON, WANG, 1998), no Japão (KOZAI et al., 1999; TEDJOSASONGKO, KOZAI, 2002) e Brasil (SPOLIDORIO et al., 2003), como ausência de transmissão pai-filho, nos Estados Unidos (LI, CAUFIELD, 1995) e Suécia (EMANUELSSON, LI, BRATTHALL, 1998); transmissão entre esposos no Canadá (KULKARNI et al., 1989), na China (REDMO EMANUELSSON, WANG, 1998), na Finlândia (SAARELA et al., 1993) e Turquia (ERSIN et al., 2004), ou compartilhamento pai-mãe-filho na China (REDMO EMANUELSSON, WANG, 1998), no Brasil (SPOLIDORIO et al., 2003) e na Turquia (ERSIN et al., 2004). A existência de genótipos não encontrados na família já foi relatada por alguns (KULKARNI et al., 1989; KOZAI et al., 1999; TEDJOSASONGKO, KOZAI, 2002; LINDQUIST, EMILSON, 2004;). Há ainda relatos de cepas idênticas de *S.mutans* em crianças de creches (MATTOS GRANER et al., 2001; TEDJOSASONGKO, KOZAI, 2002; LIU et al., 2007), não encontradas por outros (KLEIN et al., 2004).

Quanto ao número de genótipos, crianças na faixa de 0-3 anos exibem de 1 a 5 genótipos distintos de EM (CAUFIELD, WALKER, 1989; EMANUELSSON, LI, BRATTHALL, 1998; GRONROOS et al., 1998; KOZAI et al., 1999; MATTOS GRANER et al., 2001; SPOLIDORIO et al., 2003; KLEIN et al., 2004), enquanto o número de genótipos abrigados pelas mães pode ser igual (REDMO EMANUELSSON, WANG, 1998) ou maior (LI, CAUFIELD, 1995; ALALUUSUA et al., 1996; EMANUELSSON, LI, BRATTHALL, 1998; LINDQUIST, EMILSON, 2004) que o encontrado nos filhos. Em geral, os isolados pesquisados provêm da saliva, mas a colonização pode ser sítio-específica. Quando da amostragem de vários sítios (saliva sublingual, dorso da língua, mucosa dos rebordos maxilares e mandibulares e biofilme, quando havia dentes) em crianças, tanto o número de isolados (saliva – 194 e biofilme – 272), como o número de genótipos de *S.mutans* detectados (saliva – 29 e biofilme – 35) foi maior na placa (KLEIN et al., 2004). Numa comparação do total de genótipos detectados na saliva, biofilme de esmalte sem cárie e de lesão cariada, feita por GRONRÖÖS, ALALUUSUA (2000), 80% apareceram na saliva. LEMBO (2005) detectou porcentagem ainda menor (62,7%). Significa dizer que a

amostragem de saliva é bem eficiente para o isolamento de cepas de EM mas necessariamente não revela todos os genótipos. Ao se fazer análise qualitativa, é necessário amostrar múltiplos sítios da dentição (GRONROOS; ALALUUSUA, 2000). Os adultos geralmente são colonizados por múltiplos genótipos, havendo estabilidade da colonização por longo tempo (CAUFIELD, WALKER, 1989; GRONROOS et al., 1995, 1998; EMANUELSSON, THORNQUIST, 2000; REDMO EMANUELSSON et al. 2003; NAPIMOGA et al., 2004).

A estabilidade da infecção por *S.mutans* já foi demonstrada por até 25 anos (LI, CAUFIELD, 1995). No entanto, as mesmas flutuações, que ocorrem nos níveis salivares de EM, são observadas no número de genótipos encontrados ao longo do tempo em crianças (ALALUUSUA et al., 1994; REDMO EMANUELSSON et al. 2003) e em crianças e seus pais (CAUFIELD, WALKER, 1989; KULKARNI et al., 1989). Em relação à aquisição inicial, a estabilidade que se detecta na colonização de EM não é tão verdadeira quando se estudam os genótipos: 6 de 15 genótipos inicialmente detectados em 10 crianças suecas permaneceram, os outros 9 desapareceram, significando colonização transitória ou níveis abaixo do nível de detecção (LINDQUIST, EMILSON, 2004). Em 50% das crianças brasileiras acompanhadas por KLEIN et al. (2004), de 30 genótipos detectados na aquisição inicial e coletas confirmatórias subseqüentes, 19 (63,3%) foram transitórios e 11 (36,7%), estáveis. Oito desses 11 genótipos estáveis foram transmitidos pelas mães. O estudo demonstrou aumento na diversidade genotípica de *S.mutans* com o passar do tempo, persistência dos genótipos adquiridos inicialmente, normalmente os transmitidos pela mãe, perda de alguns, e aquisição de novos genótipos.

Na Suécia, EMANUELSSON, LI, BRATTHALL, (1998) encontraram grande diversidade genotípica em 18% das crianças que, individualmente, apresentaram de 1 a 3 genótipos de *S.mutans*. A reavaliação do mesmo grupo de 11 famílias, feita com um intervalo de 2 a 3 anos (EMANUELSSON, THORNQUIST, 2000) , com a idade das crianças variando dos 5 aos 8 anos, demonstrou que 9 das 11 crianças apresentaram de 1 a 2 genótipos semelhantes, e que as duas crianças restantes perderam os genótipos do estudo anterior e ganharam dois novos. Os 21 adultos mantiveram de um a dois genótipos idênticos encontrados na primeira vez. Entretanto, nove deles perderam um genótipo, e 8 ganharam de 1 a 2 novos genótipos. Em 2001, o reexame de 13 crianças não-colonizadas no estudo de 1998 mostrou que 10 permaneceram negativas para *S.mutans*. Das 3 crianças restantes

positivas para *S.mutans*, uma apresentou genótipo semelhante ao da mãe, outra apresentou genótipo semelhante ao do pai e a terceira criança apresentou genótipos diferentes de seus pais. Nenhum dos pais compartilhou genótipos idênticos entre si, mas todos os seis adultos mantiveram pelo menos 1 genótipo da primeira visita (REDMO EMANUELSSON, THORNQUIST, 2001).

3. Proposição

3. PROPOSIÇÃO

Membros de 14 famílias brasileiras de baixa renda, com primogênitos de 7 meses de idade no início, tiveram amostras de saliva coletadas e cultivadas longitudinalmente até os 30 meses de vida da criança, para isolamento de estreptococos mutans, com vistas a verificar:

- 1 - a transmissibilidade dos *S. mutans* dos adultos para as crianças;
- 2 - a similaridade dos genótipos entre membros da mesma família;
- 3 - a estabilidade e variação dos genótipos ao longo do tempo.

4. Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População

A população em estudo derivou-se de um grupo maior de mães e filhos do projeto “*Prevenção da transmissão de estreptococos mutans de mães para filhos*” realizado na Faculdade de Odontologia de Bauru – USP em conjunto com a Universidade de Pittsburgh, aprovado pelos Comitês de Ética das duas Universidades e pelo Conselho Nacional de Ética do Ministério da Saúde (Anexo 1).

Os critérios utilizados para inclusão das mães no projeto foram: ser primíparas; apresentar níveis altos ($\geq 10^6$ UFC/ml) de estreptococcus mutans (EM/ml), pelo teste simplificado *Strip mutans*[®] (Orion Diagnostica, Helsinki, Finlândia), quando a criança tinha dois meses e meio de vida; mais de 20 dentes presentes e ausência de doença sistêmica ou ingestão de medicamentos. No caso da sub-amostra (NOCE, 2005), a residência do pai na mesma casa, foi um critério adicional e o início do estudo coincidiu com os 7 meses da criança. A presença de outro adulto na casa não foi um critério para participar mas se presente uma agregada (tia ou avó), esta era convidada a entrar. Somente as mães, por fazerem parte do grupo controle do projeto, receberam tratamento odontológico desde a seleção.

Participaram do estudo 14 famílias, classificadas pela renda como de baixo nível sócio-econômico (GRACIANO, LEHFELD, NEVES FILHO, 1996), residentes em áreas de concentrações sub-ótimas de flúor (0,60 a 0,79 mg F/L) em Bauru.

A média de idade dos adultos foi $20,9 \pm 4,9$ anos, para as mães; $23,6 \pm 3,4$ anos, para os pais e $41,6 \pm 11,5$ anos para as agregadas. Todos os participantes receberam informação detalhada sobre o estudo (Anexo 2), assinando um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

4.2 Exame clínico e Questionário

Para definir a prevalência e a atividade de cárie nos adultos, foi determinado o índice CPOS, segundo os critérios da OMS, através de exames clínico e radiográfico na visita 1 (V1), ocorrida aos 7 meses de vida da criança, repetindo-se o exame clínico 4-5 meses depois (V2). Nessas mesmas visitas foram determinados os níveis de EM na saliva, para estabelecer a intensidade da infecção, e isolamento de colônias de EM, para estabelecer as vias de transmissão adulto-criança, e não o inverso, quando a criança fosse colonizada. Com vistas a determinar a estabilidade de infecção dos isolados, foi feita nova colheita de saliva ao final do estudo (V4), somente das mães. Ainda na visita 1, foi avaliado o índice de sangramento papilar (LOESCHE, 1979) de boca toda, posteriormente adaptado ao índice gengival (IG) de LOE (1967); aplicado questionário simplificado sobre saúde e levantadas as condições sócio-econômicas e escolaridade dos pais. Em todas as visitas foram investigados o uso de antibióticos nos últimos 3 meses, hábitos de risco para transmissão de EM e hábitos de higiene bucal e dieta dos bebês.

As crianças foram examinadas quanto ao número de dentes e cárie dental, pelo índice ceos, e os níveis salivares de EM em saliva não-estimulada em 4 visitas, quando contavam com 7-8 meses (V1), 11-12 meses (V2), 17-19 meses (V3) e 29-30 meses (V4).

4.3 Exame bacteriológico e isolamento de EM da saliva

As amostras de saliva dos adultos foram obtidas após mastigação de goma de parafina e mantidas em gelo até o processamento, dentro de 30-60 minutos. As amostras dos bebês foram colhidas do assoalho da boca, à medida que a saliva se formava, com uma cânula fina acoplada a uma seringa estéril, transferida para tubos *ependorf* estéreis e mantida em gelo até o processamento. Após homogeneização durante 60 segundos em agitador “vortex” (Leucotron®, Sta.Rita do Sapucaí, MG, Brasil), e diluição seriada em tampão fosfato de potássio 0,05M, pH

7,1, alíquotas de 50 µl foram semeadas com bastões de vidro em L em placas de agar SB-20, seletivo para EM, contendo 20% de sacarose e 0,2 U/ml de bacitracina (DAVEY; ROGERS, 1984), e incubadas em jaras de anaerobiose (Difco, Detroit, MI, USA), por 48 horas a 37°C. Com o emprego de microscópio estereoscópico (Wild, Heerbrugg, Suíça) as contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) foram feitas baseado na morfologia típica de EM (DAVEY E ROGERS, 1984 e AZEVEDO, ZELANTE, 1994). A seguir, até 20 colônias representativas de EM de cada placa foram passadas para caldo BHI (Difco) e incubadas por 24 horas a 37°C. Uma vez observada a pureza da cultura, 500 µl foram adicionados a 500 µl de caldo BHI com 20% de glicerol e feita a estocagem à - 86°C, para posterior identificação definitiva e genotipagem.

4.4 Identificação dos estreptococos mutans

Os estudos de identificação e similaridade dos EM foram executados na Universidade de Pittsburgh (PA, EUA) e no Instituto Forsyth (Boston, MA, EUA) sob a co-orientação do Prof. Dr. Walter A. Bretz e assessoria da Dra. Anne Tanner.

Inicialmente, as amostras foram descongeladas, homogeneizadas no vortex por 60 segundos e alíquotas de 10 µl foram inoculadas em placas de ágar sangue e incubadas por 48 horas em câmara de anaerobiose (Anexo 3) (Innovative Technology Inc., Newburyport, MA, EUA) a 37°C. Observadas a morfologia e pureza, os isolados removidos de meia placa de ágar sangue foram conservados em 100 µl de solução TE (50 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6) e mantidos a - 20°C até sua identificação pelo método de *hibridização DNA-DNA checkerboard* (SOCRANSKY et al, 2004) e genotipagem por reação em cadeia da polimerase com iniciadores arbitrários (AP-PCR).

Hibridização DNA-DNA checkerboard. Alíquotas de 20 µl da suspensão descongelada dos isolados foram adicionadas a tubos *ependorf* contendo 55 µl de TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6). A seguir, foram adicionados mais 50 µl NaOH a 0,5 M, as suspensões foram fervidas em banho-

maria por 10 minutos e neutralizadas pela adição de 400 µl de acetato de amônia a 5M filtrado. O DNA liberado foi depositado em uma das canaletas do *Minislot 90* (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) (Anexo 3), e depois concentrado em uma membrana de *nylon* (15 x 15cm) com carga positiva (Roche, Indianápolis, IN, EUA). O *Minislot 90* permite a deposição de 84 amostras diferentes em canaletas individuais, e de 6 canaletas para os controles representados por um “pool” de bactérias, com 10^5 e 10^6 UFC/ml, dentre as quais encontram-se 10 espécies de bactérias Gram positivas – *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans* (2) e *Streptococcus sobrinus* (2).

Após remoção da membrana do *Minislot 90*, o DNA foi fixado à mesma por luz ultravioleta (*Stralinker® 1800*, Stratagene, La Jolla, CA, EUA), seguido da secagem da membrana a 80° C por 10 minutos e sua armazenagem a 4° C até os processos de pré-hibridização e hibridização.

As membranas foram pré-hibridizadas a 42° C por 1 hora, em uma solução contendo 50% formamida, 2 x SSC (*standard saline citrate* - 1 x SSC = 150mM NaCl, 15mM de citrato de sódio, pH 7,0), 1% de caseína (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 5x de reagente de Denhardt's (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, EUA), 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, EUA).

As sondas de DNA genômico total para as espécies acima citadas foram preparadas pela marcação de 1 ng e 10 ng de DNA de cada espécie com digoxigenina (Random primer digoxigenin labeling kit, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA), de acordo com FEINBERG E VOGELSTEIN (1983). As sondas foram desnaturadas a 100° C por 5 minutos em cada tampão de hibridização que continha a sonda, e mantidas no gelo.

Para a hibridização, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* (Immunetics) (Anexo 3) de forma que as linhas de DNA ficassem perpendiculares aos canais de hibridização. Em cada canal, foi adicionada uma sonda de DNA (20ng/ml) em 160 µl da solução de hibridização composta de 45% de formamida, 5 X SSC, 1 X de reagente de Denhardt's, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim), 10% de sulfato de dextrano e 1% de caseína (Sigma). A hibridização ocorreu por uma noite a 42° C.

Após a hibridização, as membranas foram removidas do *Miniblotter* e lavadas duas vezes (25 minutos cada uma) no aparelho *Disk Wisk* (Schleicher e Schuell, Keene, NH, USA) (Anexo 3) a 68° C em solução tampão composta de 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na₂HPO₄, a fim de remover as sondas que não foram hibridizadas completamente.

Para a detecção dos híbridos, as membranas foram bloqueadas por imersão durante 1 hora numa solução contendo 1% de ácido maléico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, 0,5% de caseína, pH 8,0, sob agitação. A seguir, as membranas foram incubadas numa solução com anticorpos anti-digoxigenina conjugados a fosfatase alcalina diluída a 1:10.000 por 30 minutos em agitador.

As membranas foram depois lavadas 4 vezes, por 10 minutos, em solução de 0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1 M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, 50 mM de MgCl₂, pH 9,5.

Para que os híbridos fossem visualizados, as membranas foram transferidas para uma película plástica e incubadas a noite toda em temperatura ambiente em uma solução reveladora à base de fosfato e uma substância quimioluminescente (Gene Images™ ECF™ Detection Kit - GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, England, UK) sendo feita a sua leitura através do escâner de fluorescência (Molecular Dynamics Inc, Sunnyvale, CA, EUA) (Anexo 3).

4.5 Genotipagem dos *Streptococcus mutans* por AP-PCR

Extração do DNA. Para os isolados identificados como *S.mutans*, o protocolo de extração de DNA, para a AP-PCR, foi adaptado do manual de extração do *DNeasy Tissue Kit* (Anexo 3)(QIAGEN, Valencia, CA, EUA).

Os isolados mantidos em 100 µl de solução TE foram descongelados, centrifugados por 10 minutos, a 10.000 x g e o sobrenadante descartado. Ao sedimento foram adicionados 160 µl de solução tampão enzimático (20 mM Tris-HCl,

pH 8.0; 2 mM EDTA; 1.2% Triton[®] X-100), 20 µl de lisozima (180 mg/ml, Difco) e 20 µl de acromopeptidase (2.500 U/ml, Difco) seguidos de incubação em banho-maria por 1 hora a 37°C.

A seguir, foram adicionados ao tubo 25 µl de Proteinase K e 200 µl de solução tampão AL, ambas fornecidas pelo *kit*, e incubação por uma noite a 55°C. Após essa incubação, foram adicionados à suspensão 200 µl de etanol (96%), com agitação delicada até a mistura ficar homogênea. Nesta fase observava-se a precipitação do DNA na solução. Toda a mistura foi então transferida para uma coluna (*DNeasy spin column*), com um filtro (*DNeasy membrane*) e um orifício (Anexo 3), encaixada em um tubo coletor, e centrifugada a 10.000 x g por 1 minuto, com descarte do tubo coletor. A coluna foi então adaptada a um novo tubo coletor, adicionada de 500 µl da solução AW1 (*kit*) e centrifugada a 9.000 x g por 1 minuto. Após o descarte, novo tubo coletor foi recolocado, no qual foram adicionados 500 µl de solução AW2 (*kit*) e feita a centrifugação a 14.000 x g por 3 minutos. Descartado o último tubo coletor, a coluna foi colocada num novo tubo *ependorf* de 1.5 ml e, sobre o filtro, colocados 100 µl de solução AE para extração do DNA preso ao mesmo. Após um período de incubação de 1 minuto a temperatura ambiente, foi feita a centrifugação a 10.000 x g por 1 minuto e a eliminação da coluna, com a amostra de DNA sendo então mantida no *ependorf* em freezer a -20°C.

A concentração de DNA de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro (NanoDrop[®] ND-1000, Atkinson, NH, USA).

Genotipagem por AP-PCR. A amplificação por AP-PCR foi feita num volume de 50 µl de reação de PCR contendo 25 µl de solução para PCR *Choice™ Taq Mastermix DNA polymerase* (Denville Scientific Inc. Metuchen, NJ, USA), com 2,5U de *Taq DNA Polymerase*, 20 mM Tris-HCl (pH 9,0), 3,0 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Triton X-100, dNTP mix (1,5mM MgCl₂); 0,4 mM de primer OPA-02 (oligonucleotídeo 5' – TGCCGAGCTG – 3' - Invitrogen Co. Carlsbad, CA, USA); 2 µl de amostra de DNA (média de 170 ng/µl) e 22 µl de água destilada UltraPure DNAase/RNAase-free (Invitrogen).

A amplificação do AP-PCR no termociclador (PTC 200 Thermal Cycler, GMI Ramsey, Minnesota, EUA) (Anexo 3) seguiu o protocolo de Saarela et al.

(1996), com 35 ciclos nas temperaturas de 94°C durante 1 minuto; 36°C por 2 minutos e 72°C durante 2 minutos. A desnaturação inicial foi feita a 94°C por 5 minutos, e a extensão final a 72°C por 5 minutos (Figura 1). Um controle negativo sem amostra de DNA foi incluído a cada reação de AP-PCR. Os controles positivos foram representados por 3 amostras de *S.mutans* de membros de famílias diferentes e uma amostra de *S.sobrinus*.

Figura 1 - Ciclos do termociclador, programado segundo SAARELA et al 1996

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese (Model B2 EasyCast™ Mini Gel Electrophoresis System, Thermo Fisher Scientific, Portsmouth, NH) (Anexo 3) em agarose gel (Seakem® LE Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc, Rockland, ME, EUA) a 1,2% em tampão 5 x TBE (Tris-Borato-EDTA) em corrida a 70V (Power Pac 3000, RIO-RAD, Hercules, CA, USA) (Anexo 3) por duas horas e trinta minutos em tampão 0.5 x TBE. Um marcador padrão de peso molecular de 1 kbp (250 a 10.000 pares de base - Promega Co., Madison, WI, EUA) foi adicionado a cada gel. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio a 0,25% (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), visualizado, fotografado por luz ultravioleta (Multimage Light Cabinet, Alpha Innotech Co., San Leandro, CA, EUA) (Anexo 3) e suas imagens salvas no formato TIFF.

Os padrões de banda gerados no gel de cada isolado da mesma família foram analisados lado a lado, visualmente, e uma matriz de 0 e 1 foi construída baseada na ausência (0) e presença (1) das bandas marcadas. Os padrões dos genótipos foram considerados similares quando a maioria das bandas era idêntica em alcance entre 250 e 1500 bp.

4.6 Análise Estatística

As variáveis do Índice gengival, o índice CPO-S e o nível de EM na saliva dos adultos foram comparados através do teste de Mann Whitney. As variáveis EM na saliva e hábitos de risco dos adultos, o tempo de amamentação, e a renda familiar foram comparadas com a presença e ausência de cárie na criança pelo teste de Mann Whitney. A relação entre a presença de cárie nas crianças e o tipo de parto (normal ou cesariana) ou a presença de açúcar em sua dieta foi pesquisada pelo teste exato de Fisher, e, com a raça, pelo teste Qui-quadrado.

Foi utilizado o teste de Spearman determinar a correlação entre o tempo de aquisição inicial dos EM na saliva nas crianças e o número de dentes e nível de EM na saliva nas quatro visitas. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Dados clínicos e quantificações de EM

Na tabela 1 estão representados a idade, número de dentes e os valores médios dos índices CPOS e gengival (IG), bem como os escores médios de EM quantificados nas salivas dos adultos das 14 famílias nas visitas 1 e 2, enquanto na tabela 2, as médias e desvios-padrão desses indicadores. Feita a comparação dos indicadores clínicos entre mães, pais e agregadas pelo teste de Mann Whitney, não se observou diferença significativa entre mães e pais para o índice CPO-S ($p=0,285$). Todavia, a comparação de ambos com as agregadas resultou significativa para as mães ($p=0,010$) e os pais ($p=0,002$), face ao alto número de extrações nas agregadas. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre mães, pais e agregadas para o IG ($p>0,05$).

O escore médio de EM na saliva das mães foi bem mais elevado que o dos pais e agregadas, pelo teste de Mann Whitney, resultando em $p=0,027$ na comparação entre os primeiros, e $p=0,008$ entre mães e agregadas. Não houve diferença quando comparados os escores de EM na saliva dos pais e agregadas ($p=0,238$).

Tabela 1 – Características clínicas e escores de EM das 14 Famílias

Família		Idade	nº dentes	IG	CPO-S	EM*
1	Mãe	16	25	0,85	22	4
	Pai	23	30	1,52	21	2
	Avó	43	15	1,09	87	2
2 [#]	Mãe	18	28	1,31	12	4
	Pai	25	26	0,64	24	2
	Avó	49	24	0,35	47	1
3	Mãe	19	27	1,25	33	3
	Pai	20	25	0,70	23	2
4 [#]	Mãe	23	28	1,61	20	4
	Pai	24	30	1,15	34	2
	Avó	51	22	1,00	59	1
5 [#]	Mãe	21	28	0,61	24	4
	Pai	20	31	1,68	19	3
6	Mãe	25	31	1,03	13	2
	Pai	22	32	1,43	15	2
	Avó	44	31	1,32	24	1
7	Mãe	19	27	0,96	24	3
	Pai	20	28	1,00	5	2
8	Mãe	18	28	1,42	9	1
	Pai	25	30	1,33	17	1
9	Mãe	19	26	1,27	46	1
	Pai	24	31	1,14	8	2
10	Mãe	17	27	0,58	9	2
	Pai	18	29	1,08	8	1
	Avó	36	18	0,86	62	2
11	Mãe	35	30	0,93	47	2
	Pai	26	28	1,00	1	0
	Tia	16	28	1,27	10	2
12	Mãe	23	25	1,25	42	4
	Pai	31	30	1,53	20	4
13	Mãe	23	27	1,50	51	4
	Pai	27	27	1,17	43	2
	Avó	51	10	1,12	92	1
14	Mãe	17	28	1,77	14	4
	Pai	25	26	1,05	39	2
	Avó	43	0		128	2

* Escores EM/ml de saliva: 1 - $<10^5$; 2 - $\geq 10^5 < 5 \times 10^5$; 3 - $\geq 5 \times 10^5 < 10^6$; 4 - $\geq 10^6$ [#] Famílias onde as crianças apresentaram cárie aos 30 meses

Tabela 2 – Médias e desvios-padrão das características clínicas e escores de EM dos adultos das 14 famílias

Integrante	Idade	nº dentes	IG	CPOS	EM
Mãe	20,93	27,50	1,17	25,50	3,00
	± 4,89	± 1,65	± 0,30	± 14,96	± 1,17
Pai	23,57	28,78	1,17	19,57	1,92
	± 3,41	± 2,15	± 0,30	± 12,24	± 0,91
Agregada	41,62	18,50	1,00	63,37	1,50
	± 11,51	± 10,11	± 0,33	± 38,40	± 0,53

A Tabela 3 apresenta o número de dentes irrompidos, índice ceos e escores de EM na saliva das crianças nas quatro visitas. Uma criança não compareceu na visita 4 (# 7). Na V4, todas as crianças apresentavam dentição completa sendo que apenas três desenvolveram cárie, uma do gênero masculino (# 4) e duas do gênero feminino (# 2 e 5). Além dessas, outras sete apresentaram EM, restando apenas três crianças (# 3, 6 e 13) sem EM na última visita.

Tabela 3 – Número de dentes irrompidos, ceos e escores de EM nas 14 crianças

Criança (Gênero)	nº dentes				ceos	Escore de EM/ml			
	V1	V2	V3	V4		V1	V2	V3	V4
1 (F)	0	4	7	20	0	0	0	4	1
2 [◇] (F)	0	4	10	20	4	0	1	4	2
3 (M)	0	5	10	20	0	0	0	0	0
4 [◇] (M)	0	5	12	20	1	1	0	4	2
5 [◇] (F)	0	8	13	20	4	0	0	0	3
6 (F)	0	8	12	20	0	0	0	0	0
7 (F)	0	2	7	*	*	0	1	0	*
8 (M)	0	6	12	20	0	0	0	0	2
9 (M)	0	6	11	20	0	0	0	0	1
10 (M)	0	4	6	20	0	0	0	0	1
11 (F)	0	2	7	20	0	0	0	0	1
12 (F)	0	8	12	20	0	0	0	0	1
13 (F)	0	5	12	20	0	0	0	0	0
14 (F)	0	2	12	20	0	0	0	0	1

* - Não compareceu à avaliação

◇ - Crianças com cárie

O teste de Spearman não mostrou correlação entre o maior ou menor número de dentes e o momento de detecção inicial dos EM nas crianças (Tabela 4).

Tabela 4 – Correlação entre o número de dentes e o momento de detecção (MD) inicial de EM pelo teste de Spearman*

	n	r	p
nº dentes V2 x MD	14	0,253	0,382 _{ns}
nº dentes V3 x MD	14	0,274	0,341 _{ns}

*Significante: $p < 0,05$

Com base na ausência ou presença de cárie, as crianças foram divididas em dois grupos que foram, então, comparados relativamente a algumas variáveis já associadas com essa condição. A comparação entre os valores médios de CPOS e EM na saliva das mães e pais das crianças com e sem cárie pelo teste de Mann Whitney não revelou diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Comparação dos índices CPOS e escores de EM dos pais de crianças com e sem cárie pelo teste de Mann Whitney*

Crianças (n)		CPOS		EM/ml	
		Mãe	Pai	Mãe	Pai
Com cárie (3)	Média	18,67	25,67	4,00	2,33
	DP	6,11	7,64	0	0,57
Sem cárie (10)	Média	28,00	19,20	2,70	1,80
	DP	17,05	12,94	1,25	1,03
	<i>p</i>	0,573 _{ns}	0,370 _{ns}	0,160 _{ns}	0,370 _{ns}

*Significante: $p < 0,05$

Os dois grupos de crianças não diferiram significativamente quanto a variáveis como tempo de amamentação (teste de Mann Whitney), gênero, uso de açúcar ou forma de nascimento - parto normal ou cesariana (teste exato de Fisher) ou raça (teste do Qui-quadrado). No entanto, a comparação dos escores de EM na saliva na última visita mostrou que as crianças com cárie apresentaram maior escore de EM, pelo teste de Mann Whitney ($p=0,013$). As médias e desvios-padrão dos escores de EM na saliva de crianças com e sem cárie foram, respectivamente, $2,33 \pm 0,57$ e $0,70 \pm 0,67$.

A tabela 6 indica o número de hábitos de risco: *compartilhar colher; assoprar colher; dormir na mesma cama e beijar a criança na boca*, dos familiares de crianças dos dois grupos. A comparação entre eles pelo teste de Mann Whitney não revelou diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Tabela 6 - Hábitos de risco (n=4) dos adultos das famílias de crianças com e sem cárie

Crianças	Família	Mãe	Pai	Agregada
Com cárie	2	4/4	2/2	2/2
	4	1/4	1/4	1/4
	5	3/4	4/4	-
Média e DP		2,66 $\pm 1,52$	2,33 $\pm 1,52$	1,5 $\pm 0,70$
Sem cárie	1	3/4	4/4	3/4
	3	1/4	3/4	-
	6	0	2/4	2/4
	7	0	3/4	-
	8	3/4	3/4	-
	9	2/4	1/4	-
	10	4/4	3/4	0
	11	2/4	1/4	0
	12	1/4	2/4	-
	13	4/4	2/4	2/4
	14	2/4	3/4	0
Média e DP		2,2 $\pm 1,31$	2,4 $\pm 0,96$	1,16 $\pm 1,32$
p^*		0,69 _{ns}	0,93 _{ns}	0,85 _{ns}

*Significante: $p < 0,05$

5.2 Identificação e genotipagem dos estreptococos mutans

Identificação. Do total de 565 isolados pesquisados, 551 (97,5%) foram identificados como estreptococos mutans, sendo 506 *Streptococcus mutans*, 45 *Streptococcus sobrinus* e 14 não foram identificados. Para a genotipagem foram selecionadas apenas 8 famílias por apresentarem EM em todos os membros, como ilustração, a Figura 2 mostra o resultado da identificação dos EM por hibridização DNA-DNA de algumas crianças.

Figura 2 – Exemplo de um *Checkerboard* usado para detectar 8 espécies bacterianas em isolados de algumas crianças. As linhas verticais contêm as sondas das espécies indicadas abaixo na figura. As linhas horizontais possuem as amostras dos isolados das crianças. As duas últimas linhas horizontais estão os controles padrões 10^5 e 10^6 UFC/ml.

Genotipagem. A tabela 7 mostra o total de isolados de *S.mutans* examinados nas 8 famílias. As reações com o iniciador OPA-02 dos 506 isolados de *S.mutans* geraram até 15 bandas, com peso variando entre 250 e 2500 pb. (Figura 3). A análise dos géis com os produtos do iniciador OPA-02 foi realizada por comparação visual. O total de genótipos detectados foi 20, com um máximo de 4 genótipos nos adultos e máximo de 2 nas crianças.

Tabela 7 – Total de isolados de *Streptococcus .mutans* genotipados nos membros das 8 famílias

Família	Mãe	Pai	Agregada	Criança	Total
1	23	16	19	20	78
2	12	20	19	30	81
4	30	19	21	12	82
5	28	20	NT	10	58
7**	20	10	NT	10	40
8	28	20	NT	10	58
10	23	12	24	6	65
12	20	18	NT	6	44
Total	184	135	83	104	506

NT – Não tem; ** Não compareceu à visita 4

Na amostra total foram detectados 20 genótipos.

Figura 3 – Fotografia do gel de agarose, onde os produtos de reação de amplificação com o iniciador arbitrário de isolados de *S. mutans* da família 2 foram submetidos à corrida eletroforética. Linha 1 – peso molecular (M) utilizado foi DNA 1 kpb; linhas 1 a 7 – isolados da criança (linhas 2 e 3, V2; linhas 4 e 5, V3; linhas 6 e 7, V4); linhas 8 a 11 – isolados da mãe (linha 8, V1; linha 9, V2; linhas 10 e 11, V4); linhas 12 a 15 – isolados do pai (linhas 12 e 13, V1; linhas 14 e 15, V2); Linhas 16 a 19 – isolados da agregada (linhas 16 e 17, V1; linhas 18 e 19, V2)

A tabela 8 apresenta a distribuição dos genótipos de *S.mutans* nos membros das famílias longitudinalmente. As letras maiúsculas codificam os genótipos adquiridos intrafamiliar, não havendo similaridade interfamiliar.

Tabela 8 – Distribuição dos genótipos dos *Streptococcus mutans* identificados durante as visitas

Família	Mãe			Pai		Agregado		Criança			
	V1	V2	V4	V1	V2	V1	V2	V1	V2	V3	V4
1	AB	B	AB	A	A	A	AB	▣	▣	A	A
2	A	B	AB	ABC	ABC	ABC	ABC	▣	AB	A	AB**
4	AC	AC	ABC	ABC	AB	ABC	ABC	▣	▣	AB	AB**
5	AB	AB	AB	AB	AB	-	-	▣	▣	▣	A**
7	AD	ABC	*	CD	*	-	-	▣	AB	▣	*
8	AB	AB	A	A	AB	-	-	▣	▣	▣	A
10	ABC	AB	C	BD	BC	B	BCDE	▣	▣	▣	A
12	ABC	BC(FG)	*	AB (FG)	AC (F)	-	-	▣	▣	▣	A

- sem agregada; f – faltou a visita; ▣ cultura negativa para EM

** crianças que apresentaram cárie na última visita; as letras maiúsculas indicam genótipos idênticos dentro da família; Letras F, G representam genótipos de *Streptococcus sobrinus* compartilhados na Família 12.

Convencionando como estável o genótipo detectado em pelo menos duas ocasiões, em todas as famílias foram encontrados genótipos compartilhados estavelmente pelos adultos, exceto na família 12, sendo que a família 7 ficou prejudicada pelas faltas de seus membros. Entre adultos e crianças somente nas famílias 1, 2 e 4. Necessitando comprovação longitudinal, quer seja por serem isolados na última visita ou por serem perdidos em visita posterior, alguns genótipos sugerem transmissão possível ou transitória entre adultos (famílias 1,4,8,10,12) e entre adultos e crianças (famílias 5, 8, 10, 12). Apenas um genótipo, o E, da agregada da família 10, entre os 20 detectados, não foi compartilhado (Tabelas 9 e 10)

Tabela 9 – Estabilidade dos genótipos nos membros das 7 famílias

Família	Total de genótipos	Membros	Genótipos				
			A	B	C	D	E
1	2	M	E	E	-	-	-
		P	E	-	-	-	-
		A	E	N	-	-	-
		C	E	-	-	-	-
2	4	M	E	E	-	-	-
		P	E	E	E	-	-
		A	E	E	E	-	-
		C	E	E	-	-	-
4	2	M	E	N	E	-	-
		P	E	E	P	-	-
		A	E	E	E	-	-
		C	E	E	-	-	-
5	2	M	E	E	-	-	-
		P	E	E	-	-	-
		C	N	-	-	-	-
8	2	M	E	P	-	-	-
		P	E	N	-	-	-
		C	N	-	-	-	-
10	4	M	E	E	N	-	-
		P	-	E	N	P	-
		A	-	E	N	N	N
		C	N	-	-	-	-
12	3	M	P	E	E	-	-
		P	E	P	N	-	-
		C	N	-	-	-	-

E – estável; N – novo; P – perdido

Tabela 10 - Transmissão dos genótipos das 7 famílias

TIPO	FAMÍLIAS						
	1	2	4	5	8	10	12
ESTÁVEL							
Adulto x Adulto	A	ABC	ABC	AB	A	B	-
Adulto x Criança	A	AB	AB	-	-	-	-
POSSÍVEL OU TRANSITÓRIA							
Adulto x Adulto	B	-	BC	-	AB	CD	ABC
Adulto x Criança	-	-	-	A	A	A	A
SEM TRANSMISSÃO							
Agregada	-	-	-	-	-	E	-

A tabela 11 retrata a distribuição dos genótipos em membros isolados ou associação de 2 ou mais integrantes.

Tabela 11 – Encontro de genótipos em um ou associação de membros das 8 famílias

Membros	Famílias								Total de Famílias
	1	2 [#]	4 [#]	5 ^{#*}	7 [*]	8 [*]	10	12 [*]	
M	-	-	-	-	-	-	-	-	0
P	-	-	-	-	-	-	-	-	0
A	-	-	-	-	-	-	-	-	0
C	-	-	-	-	-	-	-	-	0
M x P	-	-	-	B	C,D	B	-	B,C,F,G	4
M x A	B	-	-	-	-	-	-	-	1
M x C	-	-	-	-	A,B	-	A	-	2
P x A	-	C	-	-	-	-	D	-	2
P x C	-	-	-	-	-	-	-	-	0
A x C	-	-	-	-	-	-	-	-	0
M x P x A	-	-	C	-	-	-	B,C	-	2
M x P x C	-	-	-	A	-	A	-	A	3
P x A x C	-	-	-	-	-	-	-	-	0
M x P x A x C	A	A,B	A,B	-	-	-	-	-	3

M – Mãe; **P** – Pai; **A** – Agregada; **C** – Criança; * Família sem agregada; [#] crianças com cárie

A Figura 4 representa as fontes de transmissão dos *Streptococcus mutans* entre os indivíduos da mesma família, quando a criança está envolvida. A criança compartilhou genótipos com a mãe e o pai em três famílias (modelo I – famílias 5, 8 e 12); com a mãe, o pai e a agregada em três famílias (modelo II – famílias 1, 2 e 4); somente com a mãe, que por sua vez compartilhava outros genótipos com o pai (modelo III – família 7) e somente com a mãe, que compartilhava outro genótipo só com o pai e outros dois com o pai e a agregada (modelo IV – família 10).

Figura 4 - Transmissão intrafamiliar indicado pela similaridade dos genótipos da Tabela 8

Nas oito crianças, que tiveram *S. mutans* identificados e genotipados, foram encontrados genótipos similares aos maternos em 100%, similares aos genótipos paternos em 75% (6/8) e em 75% (3/4) das agregadas. Todas as mães compartilhavam genótipos com todos os membros da família (Tabela 8).

Não houve correlação entre o número de genótipos e a presença de cárie, pelo teste de Spearman ($p > 0,05$).

A criança da família 5 apresentou *Streptococcus sobrinus* apenas na Visita 3. Esses isolados não foram genotipados devido à ausência da subespécie nas visitas subseqüentes e nos adultos. Os adultos da Família 12 apresentaram e compartilhavam *S. sobrinus*, entretanto, este não foi encontrado na criança.

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

Os estudos de transmissão de EM para crianças geralmente envolvem pares de mães e filhos, pelo fato óbvio de maior contato entre eles. Em consequência, as medidas preventivas para reduzir a colonização por EM e o desenvolvimento de cárie nas crianças concentram-se na figura materna. Estudos clássicos de KOEHLER et al. (1984) e TENOVUO et al. (1992) demonstraram que o tratamento com gel de clorexidina de mães altamente infectadas por EM reduzia tanto a colonização, como o desenvolvimento de cárie em seus filhos. Analisando a literatura posterior, porém, BRAMBILLA (2004) concluiu que aplicações tópicas de agentes antibacterianos podem reduzir a transmissão de EM de hospedeiro para hospedeiro, mas que isso não resulta necessariamente em menos cárie, daí o interesse em examinar o papel dos demais membros da família nesse quadro.

O exame clínico dos membros das famílias deste estudo revelou, especialmente nas mães e pais, índice CPO-S relativamente alto e leve sangramento gengival ($< 2,0$), compatíveis com a idade da população. Todavia, a presença de superfícies com cárie aberta em todos os membros indica a dificuldade dessas famílias buscarem tratamento, seja pela condição sócio-econômica, seja pela desinformação, fato que assume importância considerável quando se constata que esse grupo faz parte de um universo de 79,9% da população brasileira que recebem até cinco salários mínimos por mês (IBGE, 2005), e que 50% das mães tinham apenas o ensino fundamental. PERES et al. (2000) apontam a baixa renda familiar como o principal fator de risco para a cárie, e uma revisão dos recentes modelos multifatoriais de avaliação de risco informa que variáveis sócio-demográficas são

muito importantes para modelos de previsão para crianças pequenas e adultos mais velhos (POWELL, 1998).

Lesões de cárie não tratadas são uma fonte de EM. Baixos níveis sócio-econômicos (WAN et al., 2001) e de escolaridade da família, como os vistos neste grupo, têm sido relacionados com a colonização precoce e altos níveis de EM na saliva das crianças (KOHLE, ANDREEN, JONSSON, 1984). Significativamente, a colonização por EM foi observada em todas as famílias, com prevalência de 100% nas mães e agregadas e de 90% nos pais. Todavia, tem sido sugerido que o maior risco de infecção nas crianças esteja relacionado com níveis salivares altos de EM nas mães (KOHLE, BRATTHALL, KRASSE, 1983; ROETERS et al., 1995; BRAMBILLA et al., 1998; SPOLIDORIO et al., 2003). Escores médios de EM $\geq 10^5$ UFC/ml de saliva foram observados em 12 das 14 mães. Esses níveis são compatíveis com maior risco de transmissão da infecção para as crianças (KOHLE, BRATTHALL, 1978). Mas não apenas isso: essas mães apresentaram escores de EM significativamente maiores que os dos pais e agregadas, continuando, com raras exceções, como um grupo de alto risco de cárie para elas mesmas, e de alto risco para a transmissão de EM como já o eram no momento da seleção da amostra. Outra observação, que se faz no grupo, é a de que altos níveis de EM nas mães não implicam, necessariamente, em automática colonização dos filhos, conforme visto no caso da mãe da família 13 e já constatado por outros (KOHLE; BRATTHALL, 1978; EMANUELSSON, LI, BRATTHALL, 1998).

Posto que houvesse vários aspectos comuns entre essas famílias, a colonização pelos EM e o desenvolvimento de cárie em seus primogênitos foram heterogêneos, em conformidade com a complexidade dos eventos da transmissão, que incluem não apenas o número de microrganismos disponíveis para aderir, mas também sua afinidade pelo hospedeiro, a frequência de transferência, fatores do hospedeiro que interferem na aderência ou crescimento bacteriano, sobrevivência bacteriana durante a transferência, tipo de dieta do hospedeiro (VAN HOUTE, GREEN, 1974), o tipo de parto (LI et al., 2005) ou a duração e intensidade da amamentação (LI, WANG, CAUFIELD, 2000).

Nas quatro visitas, respectivamente uma, duas, três e dez crianças mostraram-se positivas para EM, confirmando que o número de crianças colonizadas aumenta com a idade (KOHLE; BRATTHALL, KRASSE, 1983). Todavia, nenhuma diferença foi encontrada entre o momento de detecção e o

número de dentes nessas crianças, contrariando outros autores (CARLSSON, GRAHNEN, JONSSON, 1975; MASUDA et al., 1979; ALALUUSUA, RENKONEN, 1983; KLEIN et al., 2004). É preciso, porém, exercer extrema cautela na leitura dos resultados estatísticos quanto a todos os aspectos pesquisados, em face do pequeno tamanho da amostra.

A colonização de 21% das crianças pelos EM aos 19 meses de idade, e de 82%, aos 29-30 meses de idade, corrobora o conceito da “primeira janela da infectividade”, apregoado por CAUFIELD, CUTTER, DASANAYAKE. (1993). Nesse grupo especial, não houve a aquisição mais precoce relatada para as crianças brasileiras por KLEIN et al.(2004)

Os EM podem ser detectados na boca antes da irrupção dos dentes (MILGROM et al., 2000; TANNER et al., 2002), o que foi aqui constatado, com a observação de três crianças positivas para EM (# 2, 4 e 7), antes de um ano de idade, com níveis variando de 280 a 600 UFC/ml de saliva, geralmente considerados como de colonização transitória (CARLSSON et al., 1970; 1975; BERKOWITZ et al., 1975; 1980; MASUDA et al., 1979; ALALUUSUA, RENKONEN, 1983; DAVEY, ROGERS, 1984; FUJIWARA et al., 1991; ALALUUSUA et al., 1996). Todavia, duas dessas crianças foram densamente colonizadas por EM na visita 3, e mantiveram a colonização na visita 4. Coincidentemente, ambas exibiram cárie dental aos 30 meses de idade, uma indicação de que as crianças colonizadas mais precocemente podem apresentar maior suscetibilidade à cárie dental (ALALUUSUA, RENKONEN, 1983; KOHLER, BRATTHALL, 1978; KOHLER ET AL, 1988), e que, certamente nesses dois casos a infecção não foi transitória. Essa observação torna-se ainda mais grave, quando a literatura aponta que com a colonização precoce é maior a probabilidade de desenvolvimento de cáries nos anos seguintes (KOHLER et al., 1988; THIBODEAU, SULLIVAN, 1995). A outra criança que apresentou cárie (# 5) só veio a exibir altos níveis de EM (704.000 UFC/ml de saliva) na visita 4. Todavia, essa criança teve irrupção mais precoce dos seus dentes (13 dentes na visita 3) quando comparada com a das demais. A presença de cárie apenas nas crianças colonizadas confirma também a assertiva de que a doença é mais freqüente em crianças colonizadas do que nas não colonizadas por EM (ALALUUSUA, RENKONEN, 1983; FUJIWARA et al, 1991).

A explicação para a presença de cárie ou sua ausência não pôde ser atribuída aos níveis de cárie ou de EM das mães, que não diferiram

significativamente, conquanto quase todas preenchessem o quesito de $> 10^5$ EM/ml de saliva. Pelo menos em parte, porém, a explicação estaria nos níveis de EM significativamente maiores das crianças com cárie na última visita, confirmando estudo de MATTOS-GRANER et al. (1998). Nenhuma das outras variáveis pesquisadas (gênero, raça, tempo de amamentação, uso de açúcar, tipo de parto, número de hábitos de risco) apontou qualquer diferença entre os dois grupos.

Diferentes estudos, usando técnicas como a bacteriocinotipagem (BERKOWITZ, JORDAN, 1975; MASUDA et al., 1979; DAVEY, ROGERS, 1984; AZEVEDO, ZELANTE, 1994; GRONROOS et al., 1998), ou sorotipagem (BERKOWITZ et al., 1975; MASUDA et al., 1979; LI et al., 2001) apontaram a mãe como a principal fonte de infecção de EM para os filhos. O primeiro estudo de genotipagem a sugerir que as bactérias são transmitidas verticalmente de mãe para filho, mostrando em três pares de mãe e filho que todas as crianças adquiriram um genótipo idêntico ao materno, foi realizado por CAUFIELD, WALKER (1989), que demonstraram ainda a estabilidade de colonização em um dos pares, com o reisolamento de genótipos após intervalo de três anos. Estudos mais abrangentes (CAUFIELD, CUTTER, DASANAYAKE, 1993; LI, CAUFIELD, 1995) confirmaram a fidelidade de transmissão. Cepas de EM coincidentes com as das mães foram detectadas em mais de 70% dos pares de mães e filhos estudados por LI, CAUFIELD (1995), para os quais, a fidelidade de transmissão poderia ser ainda maior, se o número de isolados fosse maior. Essa frequência de similaridade varia, porém, entre as populações, onde as práticas culturais podem influenciar o grau de contato entre as crianças, os pais e outros indivíduos (LI, CAUFIELD, 1995; REDMO-EMANUELSSON, WANG, 1998; EMANUELSSON, LI, BRATTHALL, 1998; KLEIN et al., 2004).

Para CAUFIELD (1997), a criança deve adquirir vários microrganismos indígenas de sua mãe, que são complementares aos fatores imunes transferidos passivamente. Dessa forma, crianças adotadas logo após o nascimento poderiam ter diferente suscetibilidade a doenças infecciosas, inclusive cárie, devido às diferenças na aquisição da microbiota indígena de suas mães. FIGUEIREDO et al. (2000), investigando pares de mães e filhos adotivos, observaram genótipos homólogos em apenas 19% dos filhos. Oitenta e um por cento dos mesmos foram colonizados por EM diferentes dos das mães e muitos não apresentavam lesões cariosas e, se as possuísem, estavam presentes em menos de 25% das superfícies dentárias.

Genótipos idênticos aos maternos foram encontrados em 100% das crianças cujos isolados foram genotipados neste estudo, sendo a mãe, portanto, a principal fonte de infecção da amostra. Coincidência alta (81%) de genótipos de *S.mutans* em pares de mães e filhos foi verificada também em outra pesquisa feita no Brasil (KLEIN et al., 2004). Essa fidelidade genotípica entre mães e filhos parece estar relacionada com a frequência de contato e com o nível de *S.mutans*.

Enquanto o encontro de cepas similares de EM em mães e filhos indica uma linha materna para a transmissão, a pesquisa de genótipos similares entre pais e filhos ou pais e mães mostra resultados negativos (Li, Caufield, 1995; 1998; EMANUELSSON, LI, BRATTHALL, 1998; REDMO EMANUELSSON, THORNQUIST, 2001), ou positivos (KULKARNI et al., 1989; SAARELA et al., 1993; REDMO EMANUELSSON, WANG, 1998; KOZAI et al., 1999; TEDJOSASONGKO, KOZAI, 2002; SPOLIDORIO et al., 2003; ERSIN et al., 2004). No estudo feito com onze famílias chinesas, REDMO EMANUELSSON, WANG (1998) encontraram genótipos idênticos entre mães e filhos, pais e filhos e também entre esposos, com maior similaridade entre mães e filhos. Sem mencionar o total de genótipos detectados nos 374 isolados de membros de vinte e duas famílias brasileiras, nem a similaridade dos genótipos nos adultos, SPOLIDORIO et al. (2003) encontraram 12 bebês (54,5%) com genótipos de *S.mutans* similares aos maternos, 3 (14%) com genótipos homólogos aos paternos e 7(32%) com genótipos homólogos aos dos irmãos. Esse compartilhamento de cepas de *S.mutans* em famílias brasileiras, já fora observado através de bacteriocinotipagem por AZEVEDO, ZELANTE, em 1994.

Neste estudo, num total de 506 isolados, foram detectados 20 genótipos diferentes com ampla difusão dos mesmos entre os membros das famílias, reflexo provavelmente da maior proximidade das pessoas e do compartilhamento de utensílios que se pode prever em lares de famílias de baixa renda. Conforme observado nos modelos da Figura 4, além dos genótipos homólogos aos da mãe, as crianças compartilharam genótipos com os pais e agregadas, que por sua vez compartilhavam-nos com as mães. É interessante esse compartilhamento de genótipos com as agregadas. No Japão, não foi observada transmissão por cuidadoras outras que as mães (TEDJOSASONGKO E KOZAI, 2002). Convencionalmente, foi estipulado que o encontro do genótipo em duas ocasiões sucessivas ou não, seria indicação de colonização estável, e a perda ou aquisição recente, como indicação de colonização transitória ou possível, dada a

impossibilidade de determiná-la, em face do término do trabalho. O fato de os genótipos serem encontrados em todas as famílias antes de sua detecção na criança dá suporte à transmissão com direção única Adulto – Criança. O não encontro de genótipos alheios à família comprova que essas crianças cuidadas em casa não abrigam cepas provenientes de fontes alternativas desconhecidas, conforme visto por outros autores (KULKARNI et al., 1989; KOZAI et al., 1999; LI, CAUFIELD, 1995; EMANUELSSON, LI, BRATTHALL, 1998; TEDJOSASONGKO, KOZAI, 2002; LINDQUIST, EMILSON, 2004), ou conhecidas, como creches (MATTOS GRANER et al. 2001; TEDJOSASONGKO, KOZAI, 2002; LIU et al., 2007). De modo geral, crianças de até três anos podem abrigar de 1 a 4 genótipos (CAUFIELD, WALKER, 1989; GRONROOS et al., 1998; REDMO EMANUELSSON, WANG, 1998; EMANUELSSON, LI, BRATTHALL, 1998; KOZAI et al., 1999; MATTOS GRANER et al., 2001; KLEIN et al., 2004), e os adultos são colonizados por múltiplos clones de EM, verificando-se estabilidade da colonização por longo tempo (CAUFIELD, WALKER, 1989; GRONROOS et al., 1995; 1998; EMANUELSSON, THORNQUIST, 2000; REDMO EMANUELSSON et al. 2003; NAPIMOGA et al., 2004). Nesse estudo, o número de genótipos entre os adultos variou de 1 a 5 e entre as crianças de 1 a 2 conforme a literatura, observando-se estabilidade de alguns e flutuação no encontro de outros genótipos. O fato da maioria das crianças apresentar *S. mutans* apenas na última visita, impediu que se visualizasse o aumento na diversidade de genótipos nas mesmas, verificado por KLEIN et al. (2004).

Nem todos os genótipos, mesmos os maternos se implantaram nas crianças. ALALUUSUA et al. (1996) apontam as possíveis explicações para as crianças apresentarem menos genótipos que suas mães: o maior número de oportunidades de transmissão para as mães ao longo dos anos; maior número de fontes de infecção dos membros de suas famílias e seus companheiros, que as crianças de hoje, uma vez que a prevalência de cárie diminuiu; um reflexo, talvez, do maior nível de EM em sua infância.

Em crianças com cárie, nenhuma associação significativa foi observada entre a diversidade genotípica do microrganismo e a idade, número de dentes irrompidos, níveis de EM, ou prevalência de cárie (MATTOS-GRANER et al., 2001), mas a presença de múltiplos genótipos já foi associada à alta atividade de cárie (ALALUUSUA et al., 1996; LIU et al., 2007). Duas das três crianças com cárie aqui

estudadas apresentaram dois genótipos. Além delas, apenas uma criança (# 7), da qual não foi feita a avaliação final de cárie, por não comparecer, apresentou dois genótipos na visita 2. As demais exibiram um único genótipo.

O estudo da diversidade genética é limitado pelo custo do processamento laboratorial, o que dificulta a pesquisa de maior número de isolados que favorece maior detecção de genótipos. Para aumentar a precisão dos resultados, o número de isolados examinados em cada família, embora o número utilizado seja compatível com o pesquisado por outros autores, deveria ser maior, bem como se poderia acrescentar o exame de isolados da placa, visto que genótipos de *S.mutans* podem colonizar seletivamente sítios específicos dos dentes (GRONROOS, ALALUUSUA, 2000; REDMO EMANUELSSON et al., 2003; KLEIN et al., 2004). O exame da saliva sozinha, como tem sido feito pela maioria dos autores, é suficiente para estudar os genótipos mais prevalentes, e, portanto, os mais aptos, e talvez, mais virulentos.

As famílias das três crianças com cárie exibiram compartilhamento de genótipos entre todos os membros (modelos I e II, da Figura 4). As mães, como fonte principal de transmissão, têm sido alvo de medidas preventivas que visam retardar a reaquisição de EM e diminuir a prevalência de cárie nas crianças. Este trabalho demonstra, a partir da avaliação de um grupo pequeno, que em famílias de baixa renda, cujas condições de moradia não são ideais, é freqüente a difusão de genótipos das mães para outros membros. Dessa forma, a explicação pelo insucesso de alguns dos programas preventivos de redução de cárie nas crianças, com medidas aplicadas exclusivamente nas mães, poderia estar na facilidade de reinfecção, pela intensa transmissão intrafamiliar. Para atingir o objetivo, os programas que preconizam o uso intensivo de antimicrobianos em mães de famílias de baixa renda, deveriam se estender aos demais familiares.

7 Conclusões

7. CONCLUSÕES

Em famílias de baixa renda, cujos primogênitos são cuidados em casa pela mãe, pai e eventual agregada, são encontrados genótipos homólogos em todos os membros. Mesmo sendo a mãe a principal fonte de infecção para a criança, há também a transmissão de genótipos que são compartilhados pelos adultos, o que deve favorecer a reinfecção por esses genótipos, quando de uma eventual perda. Não foram encontrados genótipos de origem extrafamiliar.

Referências Bibliográficas

- ALALUUSUA, S, RENKONEN, OV. Streptococcus mutans establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. Scand J Dent Res. 1983 Dec;91(6):453-7.
- ALALUUSUA, S, NYSTROM, M, GRONROOS, L, PECK, L. Caries-related microbiological findings in a group of teenagers and their parents. Caries Res. 1989;23(1):49-54.
- ALALUUSUA, S, MYLLARNIEMI, S, KALLIO, M, SALMENPERA, L, TAINIO, VM. Prevalence of caries and salivary levels of mutans streptococci in 5-year-old children in relation to duration of breast feeding. Scand J Dent Res. 1990 Jun;98(3):193-6.
- ALALUUSUA, S, ALALUUSUA, SJ, KARJALAINEN, J, SAARELA, M, HOLTTINEN, T, KALLIO, M, et al. The demonstration by ribotyping of the stability of oral Streptococcus mutans infection over 5 to 7 years in children. Arch Oral Biol. 1994 Jun;39(6):467-71.
- ALALUUSUA, S, MATTO, J, GRONROOS, L, INNILA, S, TORKKO, H, ASIKAINEN, S, et al. Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. Arch Oral Biol. 1996 Feb;41(2):167-73.
- ANDRADE, J. Comparação entre teste BANA e Checkerboard DNA-DNA Hybridization no diagnóstico periodontal inicial e no monitoramento terapêutico Guarulhos, São Paulo: Universidade de Guarulhos; 2005.
- AZEVEDO, R. O emprego da bacteriocinotipagem (mutacinotipagem) no rastreamento epidemiológico de estreptococos do "grupo mutans". São Paulo, 1988. / Tese Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1988.
- AZEVEDO, RV, ZELANTE, F. Streptococci of the mutans group: confirmation of intrafamilial transmission by mutacin typing. Braz Dent J. 1994;5(1):27-34.
- BARONE, S, MACEDO, C, MARIN, JM. Arbitrarily primed polymerase chain reaction for fingerprinting the genotype identification of mutans streptococci in children with Down syndrome. Spec Care Dentist. 2005 Jan-Feb;25(1):37-42.
- BECKER, MR, PASTER, BJ, LEYS, EJ, MOESCHBERGER, ML, KENYON, SG, GALVIN, JL, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. J Clin Microbiol. 2002 Mar;40(3):1001-9.

- BERKOWITZ, RJ, JORDAN, HV, WHITE, G. The early establishment of *Streptococcus mutans* in the mouths of infants. Arch Oral Biol. 1975 Mar;20(3):171-4.
- BERKOWITZ, RJ, TURNER, J, GREEN, P. Primary oral infection of infants with *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol. 1980;25(4):221-4.
- BRAMBILLA, E, FELLONI, A, GAGLIANI, M, MALERBA, A, GARCIA-GODOY, F, STROHMENGER, L. Caries prevention during pregnancy: results of a 30-month study. J Am Dent Assoc. 1998 Jul;129(7):871-7.
- BRAMBILLA, E, CAGETTI, MG, FADINI, L, PARISET, P, STROHMENGER, L, TWETMAN, S. Chlorhexidine concentration in saliva after topical treatment with an antibacterial dental varnish. Am J Dent. 2004 Jun;17(3):196-8.
- CARLSSON, J, SODERHOLM, G, ALMFELDT, I. Prevalence of *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans* in the mouth of persons wearing full-dentures. Arch Oral Biol. 1969 Mar;14(3):243-9.
- CARLSSON, J, GRAHNEN, H, JONSSON, G, WIKNER, S. Establishment of *Streptococcus sanguis* in the mouths of infants. Arch Oral Biol. 1970 Dec;15(12):1143-8.
- CARLSSON, J, GRAHNEN, H, JONSSON, G. Lactobacilli and streptococci in the mouth of children. Caries Res. 1975;9(5):333-9.
- CAUFIELD, PW, WALKER, TM. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphisms. J Clin Microbiol. 1989 Feb;27(2):274-8.
- CAUFIELD, PW, CUTTER, GR, DASANAYAKE, AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. J Dent Res. 1993 Jan;72(1):37-45.
- CAUFIELD, PW, RATANAPRIDAKUL, K, ALLEN, DN, CUTTER, GR. Plasmid-containing strains of *Streptococcus mutans* cluster within family and racial cohorts: implications for natural transmission. Infect Immun. 1988 Dec;56(12):3216-20.
- CAUFIELD, PW. Dental caries--a transmissible and infectious disease revisited: a position paper. Pediatr Dent. 1997 Nov-Dec;19(8):491-8.
- CAUFIELD, PW. Dental caries: an infectious and transmissible disease where have we been and where are we going? N Y State Dent J. 2005 Mar;71(2):23-7.

- COGULU, D, SABAH, E, UZEL, A, OZKINAY, F. Genotyping of *Streptococcus mutans* by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down Syndrome. *Arch Oral Biol.* 2006 Mar;51(3):177-82.
- DAVEY, AL, ROGERS, AH. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. *Arch Oral Biol.* 1984;29(6):453-60.
- EMANUELSSON, IR, 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.* 1998 Oct;13(5):271-7.
- EMANUELSSON, IR, THORNQVIST, E. Genotypes of *mutans streptococci* tend to persist in their host for several years. *Caries Res.* 2000 Mar-Apr;34(2):133-9.
- EMILSON, CG, KRASSE, B. Comparison between a dip-slide test and plate count for determination of *Streptococcus mutans* infection. *Scand J Dent Res.* 1986 Dec;94(6):500-6.
- ERSIN, NK, KOCABAS, EH, ALPOZ, AR, UZEL, A. Transmission of *Streptococcus mutans* in a group of Turkish families. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Dec;19(6):408-10.
- FEINBERG, AP, VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 1983 Jul 1;132(1):6-13.
- FIGUEIREDO, MC, REIS, IC, CAUFIELD, PW. Transmissibilidade da doença cárie entre mães e filhos adotivos. *Jornal da ABOPREV.* 2000;10:3-4.
- FLORIO, FM, KLEIN, MI, PEREIRA, AC, GONCALVES, BR. Time of initial acquisition of *mutans streptococci* by human infants. *J Clin Pediatr Dent.* 2004 Summer;28(4):303-8.
- FUJIWARA, T, NAKANO, K, KAWAGUCHI, M, OOSHIMA, T, SOBUE, S, KAWABATA, S, et al. Biochemical and genetic characterization of serologically untypable *Streptococcus mutans* strains isolated from patients with bacteremia. *Eur J Oral Sci.* 2001 Oct;109(5):330-4.
- GARN, SM, ROWE, NH, CLARK, DC. Parent-child similarities in dental caries rates. *J Dent Res.* 1976 Nov-Dec;55(6):1129.
- GOLD, OG, JORDAN, HV, VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 1973 Nov;18(11):1357-64.

- GRACIANO, MI, LEHFELD, NAS, NEVES FILHO, A. Critérios de avaliação para classificação sócio-econômica: elementos de atualização - Parte II. Serviço Social e Realidade (Franca). 1996;5:171-201.
- GRONROOS, L, ALALUUSUA, S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. Caries Res. 2000 Nov-Dec;34(6):474-80.
- GRONROOS, L, MATTO, J, SAARELA, M, LUOMA, AR, LUOMA, H, JOUSIMIES-SOMER, H, et al. Chlorhexidine susceptibilities of mutans streptococcal serotypes and ribotypes. Antimicrob Agents Chemother. 1995 Apr;39(4):894-8.
- GRONROOS, L, SAARELA, M, MATTO, J, TANNER-SALO, U, VUORELA, A, ALALUUSUA, S. Mutacin production by Streptococcus mutans may promote transmission of bacteria from mother to child. Infect Immun. 1998 Jun;66(6):2595-600.
- HAMES-KOCABAS, EE, UCAR, F, KOCATAS ERSIN, N, UZEL, A, ALPOZ, AR. Colonization and vertical transmission of Streptococcus mutans in Turkish children. Microbiol Res. 2006 May 28.
- KARN, TA, O'SULLIVAN, DM, TINANOFF, N. Colonization of mutans streptococci in 8- to 15-month-old children. J Public Health Dent. 1998 Summer;58(3):248-9.
- KLEIN, MI. Transmissão, diversidade e estabilidade de genótipos de Streptococcus mutans e de Streptococcus sobrinus: estudo longitudinal em crianças. Piracicaba: Universidade de Campinas; 2003.
- KLEIN, MI, FLORIO, FM, PEREIRA, AC, HOFLING, JF, GONCALVES, RB. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus genotypes in Brazilian nursery children. J Clin Microbiol. 2004 Oct;42(10):4620-6.
- KOHLER, B, BRATTHALL, D. Intrafamilial levels of Streptococcus mutans and some aspects of the bacterial transmission. Scand J Dent Res. 1978 Jan;86(1):35-42.
- KOHLER, B, ANDREEN, I, JONSSON, B. The effect of caries-preventive measures in mothers on dental caries and the oral presence of the bacteria Streptococcus mutans and lactobacilli in their children. Arch Oral Biol. 1984;29(11):879-83.
- 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. 1988 Mar;3(1):14-7.

- KOHLER, B, BRATTHALL, D, KRASSE, B. Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in their infants. *Arch Oral Biol.* 1983;28(3):225-31.
- KOZAI, K, NAKAYAMA, R, TEDJOSASONGKO, U, KUWAHARA, S, SUZUKI, J, OKADA, M, et al. Intrafamilial distribution of mutans streptococci in Japanese families and possibility of father-to-child transmission. *Microbiol Immunol.* 1999;43(2):99-106.
- KULKARNI, GV, CHAN, KH, SANDHAM, HJ. An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of mutans streptococci. *J Dent Res.* 1989 Jul;68(7):1155-61.
- LEMBO, F. Análise genotípica e fenotípica de isolados de *Streptococcus mutans* provenientes de diferentes nichos da cavidade bucal de crianças livres de cárie e cárie ativas. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2005.
- LI, Y, CAUFIELD, PW. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. *J Dent Res.* 1995 Feb;74(2):681-5.
- LI, Y, CAUFIELD, PW. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. *Oral Microbiol Immunol.* 1998 Feb;13(1):17-22.
- LI, Y, WANG, W, CAUFIELD, PW. The fidelity of mutans streptococci transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among Chinese families. *Caries Res.* 2000 Mar-Apr;34(2):123-32.
- LI, Y, CAUFIELD, PW, EMANUELSSON, IR, THORNQVIST, E. Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. *Oral Microbiol Immunol.* 2001 Feb;16(1):16-23.
- LI, Y, CAUFIELD, PW, DASANAYAKE, AP, WIENER, HW, VERMUND, SH. Mode of delivery and other maternal factors influence the acquisition of *Streptococcus mutans* in infants. *J Dent Res.* 2005 Sep;84(9):806-11.
- LI, Y, GE, Y, SAXENA, D, CAUFIELD, PW. Genetic profiling of the oral microbiota associated with severe early-childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2007 Jan;45(1):81-7.
- LINDQUIST, B, EMILSON, CG. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. *Caries Res.* 2004 Mar-Apr;38(2):95-103.

- LIU, Y, ZOU, J, SHANG, R, ZHOU, XD. Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* in 3- to 4-year-old Chinese nursery children suggests horizontal transmission. *Arch Oral Biol*. 2007 Apr 25.
- LOE, H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol*. 1967 Nov-Dec;38(6):Suppl:610-6.
- LOESCHE, WJ. Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. *J Dent Res*. 1979 Dec;58(12):2404-12.
- LOESCHE, WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986 Dec;50(4):353-80.
- MASUDA, N, TSUTSUMI, N, SOBUE, S, HAMADA, S. Longitudinal survey of the distribution of various serotypes of *Streptococcus mutans* in infants. *J Clin Microbiol*. 1979 Oct;10(4):497-502.
- MATTOS-GRANER, RO, ZELANTE, F, LINE, RC, MAYER, MP. Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-year-old Brazilian children. *Caries Res*. 1998;32(5):319-23.
- MATTOS-GRANER, RO, LI, Y, CAUFIELD, PW, DUNCAN, M, SMITH, DJ. Genotypic diversity of *mutans streptococci* in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. *J Clin Microbiol*. 2001 Jun;39(6):2313-6.
- MILGROM, P, RIEDY, CA, WEINSTEIN, P, TANNER, AC, MANIBUSAN, L, BRUSS, J. Dental caries and its relationship to bacterial infection, hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6- to 36-month-old children. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2000 Aug;28(4):295-306.
- MINAH, GE, SOLOMON, ES, CHU, K. The association between dietary sucrose consumption and microbial population shifts at six oral sites in man. *Arch Oral Biol*. 1985;30(5):397-401.
- NAKANO, K, NOMURA, R, SHIMIZU, N, NAKAGAWA, I, HAMADA, S, OOSHIMA, T. Development of a PCR method for rapid identification of new *Streptococcus mutans* serotype k strains. *J Clin Microbiol*. 2004 Nov;42(11):4925-30.
- NAPIMOGA, MH, KAMIYA, RU, ROSA, RT, ROSA, EA, HOFLING, JF, MATTOS-GRANER, RO, et al. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. *J Med Microbiol*. 2004 Jul;53(Pt 7):697-703.

- NAPIMOGA, MH, HOFLING, JF, KLEIN, MI, KAMIYA, RU, GONCALVES, RB. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. *J Oral Sci.* 2005 Jun;47(2):59-64.
- NASCIMENTO, MM, HOFLING, JF, GONCALVES, RB. *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. *Caries Res.* 2004 Sep-Oct;38(5):454-63.
- NIE, M, FAN, M, BIAN, Z. Transmission of *mutans streptococci* in adults within a Chinese population. *Caries Res.* 2002 May-Jun;36(3):161-6.
- NOCE, E. Aquisição de *Estreptococos mutans* e periodontopatógenos por primogênitos de 7-19 meses de idade. Estudo longitudinal em famílias. Bauru: Universidade de São Paulo; 2005.
- PERES, KDA, BASTOS JRM, LATORRE MRDO. Severidade de cárie em crianças e relação com aspectos sociais e comportamentais. *Rev Saude Publica.* 2000;34:402-8.
- POWELL, LV. Caries prediction: a review of the literature. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1998 Dec;26(6):361-71.
- REDMO EMANUELSSON, IM, WANG, XM. Demonstration of identical strains of *mutans streptococci* within Chinese families by genotyping. *Eur J Oral Sci.* 1998 Jun;106(3):788-94.
- REDMO EMANUELSSON, IM, THORNQVIST, E. Distribution of *mutans streptococci* in families: a longitudinal study. *Acta Odontol Scand.* 2001 Apr;59(2):93-8.
- REDMO EMANUELSSON, IM, CARLSSON, P, HAMBERG, K, BRATTHALL, D. Tracing genotypes of *mutans streptococci* on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiol Immunol.* 2003 Feb;18(1):24-9.
- ROETERS, FJ, VAN DER HOEVEN, JS, BURGERSDIJK, RC, SCHAEKEN, MJ. *Lactobacilli*, *mutans streptococci* and dental caries: a longitudinal study in 2-year-old children up to the age of 5 years. *Caries Res.* 1995;29(4):272-9.
- ROSA, OPS, SANCHES, FAC. Transmissibilidade de *Estreptococos mutans* de mãe para filho e prevenção. *Revista Dental Press de Biologia Oral.* 2000;1(1):37-50.
- SAARELA, M, ALALUUSUA, S, TAKEI, T, ASIKAINEN, S. Genetic diversity within isolates of *mutans streptococci* recognized by an rRNA gene probe. *J Clin Microbiol.* 1993 Mar;31(3):584-7.

- SAARELA, M, HANNULA, J, MATTO, J, ASIKAINEN, S, ALALUUSUA, S. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Arch Oral Biol.* 1996 Aug-Sep;41(8-9):821-6.
- SIQUEIRA, JF, JR., ROCAS, IN, SOUTO, R, UZEDA, M, COLOMBO, AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001 Oct;92(4):451-7.
- SOCRANSKY, SS, HAFFAJEE, AD, SMITH, C, MARTIN, L, HAFFAJEE, JA, UZEL, NG, et al. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Dec;19(6):352-62.
- SPOLIDORIO, D, HÖFLING, J, PIZZOLITTO, A, ROSA, EA, NEGRINI, T, SPOLIDORIO, L. Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in Brazilian family members. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2003;34:213-7.
- TANNER, AC, MILGROM, PM, KENT, R, JR., MOKEEM, SA, PAGE, RC, LIAO, SI, et al. Similarity of the oral microbiota of pre-school children with that of their caregivers in a population-based study. *Oral Microbiol Immunol.* 2002 Dec;17(6):379-87.
- TEDJOSASONGKO, U, KOZAI, K. Initial acquisition and transmission of mutans streptococci in children at day nursery. *ASDC J Dent Child.* 2002 Sep-Dec;69(3):284-8, 34-5.
- TENOVUO, J, HAKKINEN, P, PAUNIO, P, EMILSON, CG. Effects of chlorhexidine-fluoride gel treatments in mothers on the establishment of mutans streptococci in primary teeth and the development of dental caries in children. *Caries Res.* 1992;26(4):275-80.
- THIBODEAU, EA, O'SULLIVAN, DM. Salivary mutans streptococci and incidence of caries in preschool children. *Caries Res.* 1995;29(2):148-53.
- VAN BELKUM, A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev.* 1994 Apr;7(2):174-84.
- VAN HOUTE, J, GREEN, DB. Relationship between the concentration of bacteria in saliva and the colonization of teeth in humans. *Infect Immun.* 1974 Apr;9(4):624-30.
- VAN HOUTE, J. Microbiological predictors of caries risk. *Adv Dent Res.* 1993 Aug;7(2):87-96.

- WAN, AK, SEOW, WK, PURDIE, DM, BIRD, PS, WALSH, LJ, TUDEHOPE, DI. Oral colonization of *Streptococcus mutans* in six-month-old preeruptive infants. *J Dent Res*. 2001 Dec;80(12):2060-5.
- WELSH, J, MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*. 1990 Dec 25;18(24):7213-8.
- WENNERHOLM, K, BIRKHED, D, EMILSON, CG. Effects of sugar restriction on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva and dental plaque. *Caries Res*. 1995;29(1):54-61.
- WILLIAMS, JG, KUBELIK, AR, LIVAK, KJ, RAFALSKI, JA, TINGEY, SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*. 1990 Nov 25;18(22):6531-5.

Anexos

ANEXO 1

THE FORSYTH INSTITUTE

Institutional Review Board
FWA 00000398

www.forsyth.org
W
617.262.4021
F
617.262.5200
T
617.262.0211
140 The Fenway ■ Boston, Massachusetts 02115

August 8, 2006

Dear Dr. Tanner,

Your submission to conduct research with samples from human subjects in the study ***Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of Streptococcus mutans in Brazilian families*** is hereby approved. The Forsyth IRB has issued this protocol the number **06-11**. Full board review is not required.

You will have to report all plans to make changes in the research protocol and/or consent form to the IRB, and you are not to make changes without IRB approval. This requirement will be waived only if it becomes necessary for you to eliminate immediate risk to the subjects, and the IRB must be notified of these changes as quickly as possible.

The IRB would also like to remind you that subjects who do not speak English should be presented with a consent document written in a language understandable to them. Alternately, the consent form can be presented orally, with a written summary of what is orally communicated. If the form is presented orally, a translator who is fluent in both English and the language of the subject should sign the summary document.

The IRB must be advised immediately, within 5 days, of emergent problems in the use of human subjects, including significant hazards, contraindications, or side effects of procedures. The IRB will report problems and changes in protocol to Institutional, State, or Federal authorities, as necessary.

Should you decide to advertise for the purpose of recruiting subjects for this study, you will need to submit a copy of your proposed advertisement to the IRB for review and approval prior to distribution.

The last day of approval on this application is **August 7, 2007**. If it becomes an ongoing project, you must return the Annual Status Report that will be sent to you, indicating that this is a continuing project for renewed approval. Thank you for presenting your protocol to the Forsyth IRB.

Sincerely yours,

Richard L. Pharo, ScD
Chair, Forsyth Institute IRB

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 810/2000

Processo nº 26000.013236/00-38

Registro CONEP = 1378

Projeto de Pesquisa: *Prevenção da Transmissão do Streptococos Mutans de mãe para filho*

Pesquisador Responsável: Dra. Odila Pereira da Silva Rosa

Instituição: Faculdade de Odontologia de Bauri / Universidade de São Paulo

Área Temática Especial: Pesquisa com cooperação estrangeira.

Ao se proceder a análise do protocolo em questão cabem as seguintes considerações:

a) as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais das Resoluções CNC 196/96 e 202/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;

b) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP da instituição supracitada

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta - se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, com a seguinte recomendação a ser acompanhada pelo CEP:

- incluir o nome e telefone de contato do pesquisador no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e enviar ao CEP a versão com o adendo solicitado

Situação : Projeto aprovado com recomendação.

Brasília, 22 de setembro de 2000

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP-MS

09/21/2000 THU 14:32 FAX

IRB

002

University of Pittsburgh

Institutional Review Board

MEMORANDUM

3500 Fifth Avenue
Ground Level
Pittsburgh, PA 15213
412-578-3424
Fax: 412-578-8553

TO: Walter A. Bretz

FROM: Philip Troen, M.D., Chair *PT/pc*

DATE: December 22, 1999

SUBJECT: IRB#990357: Prevention of Transmission of the Mutans Streptococci from Mother to Child

Thank you for addressing the concerns of the Institutional Review Board regarding the above-referenced proposal. This version of your proposal has been approved. **This protocol has been designated by the Board as a minimal risk protocol. Therefore, unless there is a substantial change in risk during the next renewal interval, this protocol can be expedited at its next renewal.**

Approval Date: December 22, 1999

Expiration Date: December 22, 2000

Please type the approval date on the upper right-hand corner of the consent form before copies are made for subjects to sign. The original signed consent form should be retained for the research records; a copy should be made for the medical chart (if the subject is an in-patient); and a copy should be given to the subject.

Adverse events which occur during the course of the research study must be reported to the IRB Office. Please call the IRB Adverse Event Coordinator at 578-8569 for the current policy and forms.

The protocol and consent forms, along with a brief progress report must be resubmitted at least **one month prior** to the expiration date noted above for annual renewal as required by Assurance No. M1259, given to DHHS by the University of Pittsburgh.

If your research proposal involves an investigational drug, please forward a copy of this approval letter along with a copy of the Cover Sheet, protocol, consent form(s) and drug brochure to Investigational Drug Service, PUH Pharmacy.

Please be advised that your research study may be audited periodically by the University of Pittsburgh Research Conduct and Compliance Office.

PT/pc

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 - Bauru-SP - Brasil - CEP 17043-101

C.P. 73 - PABX (014) 235-8000 - FAX (014) 223-4679

COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA

Bauru, 08 de novembro de 1999

Senhora Professora

O projeto de pesquisa encaminhado a este COMITÊ DE ÉTICA denominado "Prevenção da Transmissão de Estreptococos Mutans de Mães para Filhos", a ser desenvolvido pela Dr^a Odila Pereira da Silva Rosa, Dr. Sergio Aparecido Torres, Dr. Walter A. Bretz (Coordenador), Dr. Walter Loesche e Dr^a Lisa Weissfeld, foi encaminhado ao Relator para ser analisado do ponto de vista ético.

Na reunião de 28 de outubro p.p. o parecer do relator foi julgado pelo Comitê que o aprovou, considerando não existir questões éticas pendentes. Entretanto, como se trata de pesquisa com participação estrangeira, o projeto deverá ser encaminhado por este Comitê para a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, de acordo com o item VIII, 4, letra C, número 8 da Resolução 196/96.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Roberto Loureiro Maringoni
Coordenador Comissão Ética de Pesquisa
FOB-USP

Ilm^a Sr^a

Prof^a Dr^a. Odila Pereira da Silva Rosa

DD. Docente da Disciplina de Microbiologia e Imunologia

FOB-USP

ANEXO 2

Universidade de São Paulo

Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 - Bauru-SP - CEP 17012-901 - C.P. 73

PABX (0XX14)235-8000 - FAX (0XX14)223-4679

CONVÊNIO USP - PITTSBURGH

e-mail: convpit@fob.usp.br - Fone: (0xx14)3235-8313

Faculdade de odontologia de Bauru - USP
Comissão Nacional de Ética em pesquisa
Parecer nº 810/2000

University of Pittsburg IRB 990357
National Institute of Dental and Craniofacial
Research
Protocolo nº: DE13534
Comitê de Ética da UP
Data da aprovação: 05/11/2002
Data da renovação: 05/11/2003

CARTA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA PESQUISA

TÍTULO DO ESTUDO: Aquisição de estreptococos mutans e anaeróbios periodontopatógenos por primogênitos. Resultados preliminares

RESPONSÁVEL: FOB-USP / National Institute of Dental and Craniofacial Research

PRINCIPAL INVESTIGADOR: Dr. Walter A. Bretz, DDS, MPH, Dr. PH
Assistant Professor
University of Pittsburgh
School of Dental Medicine
3501 Terrace Street
Pittsburgh, PA 15261
Tel: 412-6488087

CO-INVESTIGADORES: Dra. Odila P.S. Rosa, DDS, PhD
Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Sede do Convênio
Bauru, São Paulo, Brasil
Tel: 014-235 8313

LOCALIZAÇÃO: Universidade de São Paulo-Bauru, Faculdade de Odontologia de Bauru, São Paulo, Brasil

Esta forma de consentimento pode conter palavras que você não entenda. Por favor pergunte aos investigadores do estudo ou alguém responsável envolvido com o estudo para explicar qualquer tipo de informação ou palavras que você não entenda.

Para quem você poderia telefonar?

Para fazer perguntas sobre o estudo e sua experiência dentro do estudo, contactar:

Luciana Zanon Fontes Lozano (Secretária do Convênio)

Tel: 014-3235 8313

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

CONVÊNIO USP – PITTSBURGH
e-mail: convpit@fob.usp.br – Fone: (0xx14)235-8313

Para apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, contactar:
Comitê de Ética em Pesquisa em seres Humanos da FOB-USP:
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 (Sala no prédio da Biblioteca, FOB-USP) ou pelo telefone
3235-8356

DESCRIÇÃO E PROPOSTA DO ESTUDO

Este é um estudo de pesquisa na área odontológica. A proposta deste estudo é investigar a similaridade dos germes que causam a cárie dental, chamados de estreptococos mutans, nas mães, pais e em um agregado quando houver. Sua esposa (ou parente) vem participando da pesquisa desde que seu bebê tinha 2 meses e meio de vida, e continuará a participar até que ele tenha 4-5 anos para avaliarmos o efeito de procedimentos preventivos sobre a transmissão dos germes para o bebê e o desenvolvimento de cárie. Pela convivência íntima do núcleo familiar existe a possibilidade de encontrarmos os mesmos microrganismos em outros membros da família não submetidos aos mesmos procedimentos da mãe, sendo, portanto de interesse o seu exame. Quanto mais soubermos sobre a distribuição desses estreptococos nas famílias, melhor se tornará o planejamento preventivo para evitar que eles colonizem cedo a boca do bebê e provoquem mais cárie. Quinze pais e um agregado, quando houver, farão parte deste estudo na Faculdade de odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo.

Se você concordar em participar deste estudo, deverá comparecer à Faculdade de Odontologia de Bauru a cada 4 meses, por um período de 2 anos para os seguintes procedimentos:

- 1) Responder a um questionário sobre a sua saúde geral.
- 2) Submeter-se a um exame clínico visando detectar a presença de cárie dental e inflamação gengival.
- 3) Submeter-se ao exame radiográfico de boca (no exame inicial e final).
- 4) Fornecer uma amostra de saliva colhida da seguinte maneira: mastigando uma goma base sem açúcar, cuspir numa placa estéril, mantida num isopor com gelo, por 5 minutos.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 - Bauru-SP - CEP 17012-901 - C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 - FAX (0XX14)223-4679

CONVÊNIO USP – PITTSBURGH
e-mail: convpit@fob.usp.br – Fone: (0xx14)235-8313

Observações:

- 1) Cada visita terá duração em torno de 40 minutos.
- 2) Nenhum tratamento dentário lhe será oferecido durante o período do estudo. Todavia, receberá informação sobre as condições de sua boca e orientação sobre a clínica da Faculdade que deverá procurar em caso de necessidade.
- 3) Sempre que comparecer receberá atestado que comprove sua ausência ao trabalho.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Não existe nenhum risco associado com a coleta de saliva.

Participação nesta pesquisa envolve exposição a radiação com radiografias de boca toda (técnica de bitewing). Isto corresponde a 1,8 mrem de radiação durante todo o estudo com mínima exposição para outras partes do corpo. Por exemplo, trabalhadores que trabalham com radiação são permitidos por lei um máximo de radiação de 50 rems por ano para qualquer parte do corpo. Os riscos associados a radiação (alteração celular ou câncer), pela baixa quantidade de exposição que você receberá neste estudo são consideradas baixas e semelhantes aos riscos diários provenientes de radiação natural.

COMPROMISSO COM O ESTUDO

A participação na pesquisa envolverá um período de 2 anos.

NOVA INFORMAÇÃO

Você será imediatamente notificado de qualquer nova informação que aparecer neste estudo que poderá fazer você mudar de idéia em relação a continuar nele.

CUSTOS/PAGAMENTOS

Não haverá despesas para você pelas visitas. Você será reembolsado pelo tempo, locomoção e outras despesas com R\$ 30,00 por visita.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

CONVÊNIO USP – PITTSBURGH
e-mail: convpit@fob.usp.br – Fone: (0xx14)235-8313

INDENIZAÇÃO POR INJÚRIA

Se for constatado que você teve uma injúria decorrente deste estudo, a Universidade de São Paulo em Bauru irá providenciar tratamento necessário. A Universidade de São Paulo não proporcionará qualquer outra recompensa relacionada com esta injúria. Em caso de injúria favor entrar em contato com a Dra. Odila Rosa no telefone 014-235 8313.

PRIVACIDADE

Todos os arquivos relacionados com esta investigação serão armazenados em um arquivo confidencial na Sede do Convênio na Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo e na University of Pittsburgh, School of Dental Medicine, 3021 Salk Annex, com o Dr. Walter Bretz. Sua identidade será indicada nos arquivos através de números. Só terão acesso a essas informações os investigadores listados na primeira página deste documento.

Você entende que toda e qualquer informação sobre você serão contidas em um departamento seguro e confidencial como acontece com arquivos médicos. Você não será mencionado em nenhum tipo de publicação ou resultados da pesquisa. No entanto em casos pouco comuns os resultados da pesquisa poderão ser inspecionados por agências do governo ou utilizadas para processos jurídicos. O Comitê de Ética da Universidade de Pittsburgh pode inspecionar os arquivos da pesquisa. É conduta da Universidade de Pittsburgh requerer que todos os arquivos deste estudo sejam guardados pelo menos 5 anos após o término de estudo.

DIREITO DE DESISTÊNCIA

Você entende que você não é obrigado a participar deste estudo e que poderá mudar de idéia e desistir de participar deste estudo a qualquer hora. Todos os cuidados e benefícios serão da mesma forma mantidos quer você participe ou não do estudo. Você não tem nenhuma obrigação de participar desta pesquisa.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

CONVÊNIO USP – PITTSBURGH
e-mail: convpit@fob.usp.br – Fone: (0xx14)235-8313

ELIMINAÇÃO DA PESQUISA

Você poderá ser eliminado do estudo se não comparecer às consultas agendadas sem justificativa ou se não colaborar com as instruções dadas pelos investigadores.

CONSENTIMENTO VOLUNTÁRIO

Tudo me foi explicado acima e não tenho nenhuma dúvida. Eu entendo que qualquer dúvida futura que eu tenha sobre este estudo será respondida pelos investigadores listados na primeira página deste documento através dos telefones dados. Quaisquer perguntas que eu tiver dos meus direitos como participante desta pesquisa serão respondidas pelo Human Subject Protection Advocate, University of Pittsburgh (412-5788570) e pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (014-32358356). Ao assinar esta forma eu consinto em participar desta pesquisa.

Assinatura do Participante

Data

CERTIFICAÇÃO DO INVESTIGADOR

Eu certifico que a natureza e o propósito, os benefícios potenciais e riscos, associados com a participação nesta pesquisa foram explicados para a pessoa mencionada acima e que quaisquer perguntas foram respondidas adequadamente.

Assinatura do Investigador

Data

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a)

portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa da **CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE**, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em participar da pesquisa proposta.

Fica claro que o paciente ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de .

Assinatura do Paciente

Assinatura do Autor

ANEXO 3

Equipamentos

Câmara de Anaerobiose (Innovative Technology Inc.)

Minislot 30 (Immunetics)

Câmara de Ultravioleta (Stralinker® 1800)

DNA PROBES

DNA SAMPLES

"MINISLOT" **"MINIBLOTTER"**

BLOT HYBRIDIZATION CHANNEL

MEMBRANE VACUUM

Miniblotter (Immunetics)

Disponível em: http://www.immunetics.com/products/miniblotters/miniblot_reg.html

Storm 860 Gel escâner laser de fluorescência (Molecular Dynamics, GE)

Disponível em:

<http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&parentid=286927&moduleid=163723&zone=#content>

Disk Wisk (Schleicher e Schuell)

DNeasy Tissue Kit (QIAGEN)

(DNeasy spin column) com um filtro (DNeasy membrane)

Termociclador (PTC 200 Thermal Cycler)

EasyCast™ Mini Gel Electrophoresis System

Power Pac 3000 (BIO-RAD)

Multimage Light Cabinet (Alpha Innotech Co)