UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia de Bauru

ANA LÍDIA SOARES COTA

Fatores de virulência de *Streptococcus mutans* e sua relação com a persistência e transmissão de genótipos entre membros de famílias brasileiras

BAURU
2013

ANA LÍDIA SOARES COTA

Fatores de virulência de *Streptococcus mutans* e sua relação com a persistência e transmissão de genótipos entre membros de famílias brasileiras

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Salete Moura Bonifácio da Silva

Versão corrigida

**BAURU
2013**

C825f Cota, Ana Lúdia Soares
Fatores de virulência de *Streptococcus mutans*
e sua relação com a persistência e transmissão de
genótipos entre membros de famílias brasileiras /
Ana Lúdia Soares Cota. – Bauru, 2013.
145 p.: il.; 31cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Salete Moura Bonifácio
da Silva

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 073/2011
Data: 30 de junho de 2011

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese, e todo o meu viver, à memória de minha mãe, **Maria José Soares Cota**. Certamente, as frases mais difíceis de serem escritas, pois nenhuma palavra será capaz de exprimir toda saudade, admiração e meu amor por você. Cheguei a pensar que minha melhor amiga tivesse me abandonado no meio do caminho... Porém, sua partida precoce me levou a repensar o mistério da vida e me deu forças para realizar mais esse sonho, que é NOSSO! No momento, lembranças carinhosas de um apoio incondicional e eternamente presente.

Te amo pra sempre...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, pela Sua compaixão e bondade infinita, alicerce perfeito nos momentos mais difíceis. Obrigada, Senhor, por não me deixar esquecer que habitas em mim e é a força que dá vida a minha alma;

A meu amado pai, **Roosevelt Patriota Cota**, por não medir esforços para me fazer feliz. Você é meu exemplo de tenacidade e ternura. Hoje somos mais que pai e filha, somos parceiros na luta diária em busca da felicidade;

A minha orientadora, **Profa. Dra. Salete Moura Bonifácio da Silva**, pelo carinho, amizade e confiança depositada. Para sempre serei grata ao seu apoio e cultivarei intenso respeito e admiração. Vou sentir saudade dos nossos longos bate-papos, regados a boas risadas e descontração;

Aos meus irmãos, **Rogério, Rafael e Ricardo Soares Cota**, pelas demonstrações de felicidade ao compartilharem minhas conquistas e por perceberem a necessidade de, mesmo à distância, sermos um só coração;

Aos meus sobrinhos, **Vinicius e João Pedro Cavalcanti Cota**, por tantos momentos plenos de paz e alegria (melhor remédio não há!) e,

A toda minha **família** (tios, tias, primos, primas e cunhadas), pelo incentivo constante e por estarem sempre presentes no meu dia a dia. Com vocês ao meu lado aprendi o que é amar sem limites...

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

À Universidade de São Paulo, por meio do magnífico reitor **Prof. Dr. João Grandino Rodas**;

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP), representada pelo ilustre Diretor **Prof. Dr. José Carlos Pereira**;

À Comissão de Pós-Graduação da FOB/USP, por meio do Presidente **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**;

À **Profa. Dra. Daniela Rios**, responsável pela área de concentração em Odontopediatria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas da FOB-USP;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de estudo e pelo auxílio financeiro à pesquisa através de recursos do Programa de Apoio à Pós-Graduação;

À **Secretaria Municipal de Saúde de Maceió-AL**, pela outorga da licença para qualificação profissional;

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da FOB/USP, **Profa. Dra. Daniela Rios**, **Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima**, **Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**, **Prof. Dr. Ruy César Camargo Abdo**, **Profa. Dra. Salete Moura Bonifácio da Silva** e **Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira**, pelos valiosos ensinamentos transmitidos;

Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria da FOB/USP, **Alexandre Alberto Pascotto Montilha**, **Gentília Borges Carvalho Tavares (Dona Lia)**, **Lilian Rosana Candida**, **Lourisvalda Celestino** e **Maria Estela Alves de Lima Ferrari**, pelo prazer da convivência e prontidão em atender;

Aos técnicos de laboratório da FOB/USP, **André Luis da Silva, Evandro José Dionísio, Marcelo Milanda Ribeiro Lopes e Thiago José Dionísio**, pela inestimável colaboração nos procedimentos laboratoriais;

À **Profa. Dra. Odila Pereira da Silva Rosa**, pelas sábias e doces palavras traduzidas em uma imprescindível contribuição na concepção deste trabalho;

Aos **Profs. Ewerton Amorim dos Santos e Heitor Marques Honório**, pelo auxílio fundamental nas análises estatísticas;

Aos alunos do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), **Guilherme Duarte Parra e Ricardo Rodrigues Luiz Perin**, pela generosidade em ajudar e paciência em aprender;

Às queridas e estimadas mestras com as quais tive o prazer de conviver ao longo de minha formação, **Profa. Dra. Maria Dânia Holanda Tenório** (Universidade Federal de Alagoas) e **Profa. Dra. Regina Célia Poli Frederico** (Universidade Norte do Paraná);

Aos inesquecíveis colegas do curso de Doutorado, **Adriana Regina Colombo Pauleto, Carla Vecchione Gurgel, Carlos Akio Saback Miura, Juliana Julianelli de Araújo, Mariana Germano Gejão, Natalino Lourenço Neto, Sileide Aparecida de Oliveira Paccola, Susy Nazaré Silva Ribeiro Amantini e Tatiana Yurico Kobayashi**;

Às amigas **Lis Regine Amaral, Sueli Amaral e Gisele Ticianelli Gabas**, por terem sido minha verdadeira família em Bauru-SP. Anos passarão e continuarei agradecendo tudo que fizeram por mim;

Aos incontáveis amigos da saudosa Maceió-AL que emanaram bons fluidos, aumentando minha força para continuar a caminhada e,

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que esta tese pudesse ser realizada.

*“Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas
sei que nada do que vivemos tem sentido, se não
tocarmos o coração das pessoas.”*

Cora Coralina

RESUMO

Streptococcus mutans (*S. mutans*) é considerado o principal agente etiológico da cárie dentária e estudos acerca de sua virulência têm sido realizados com o intuito de compreender melhor os mecanismos de patogenia da doença. Dentre outros fatores, a virulência dessa espécie bacteriana está relacionada a sua habilidade em produzir proteína ligante de glucano tipo A (GbpA) e mutacinas, proteínas que desempenham importante papel na adesão celular e colonização da superfície dentária. Desta forma, o objetivo da presente pesquisa foi analisar, geneticamente, esses fatores de virulência de *S. mutans* e verificar sua relação com a persistência e transmissão de genótipos entre os membros de oito famílias brasileiras. Foram utilizados 392 isolados clínicos de *S. mutans* obtidos a partir da saliva de 20 indivíduos adultos cárie-ativos. Os microrganismos foram previamente identificados e genotipados em um estudo anterior que avaliou sua transmissibilidade e estabilidade ao longo do tempo. As amostras estocadas a -86°C foram reativadas por semeadura em diferentes meios de cultura (água sangue e água Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose) e repicadas em caldo de Infusão de Cérebro e Coração. Após extração do DNA cromossômico bacteriano foram realizadas análises genético-moleculares, por meio da reação em cadeia da polimerase, visando a detecção nas amostras dos genes envolvidos na produção de GbpA (*gbpA*) e codificadores dos tipos I, II, III e IV de mutacinas (*mutAI*, *mutAII*, *mutAIII* e *mutAIV*). Os dados obtidos foram analisados por meio das estatísticas descritiva e inferencial, utilizando-se os testes de Qui Quadrado, *Odds Ratio* (OR) e exato de Fisher, a um intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível de significância de 5%. Os genes *gbpA*, *mutAI*, *mutAII*, *mutAIII* e *mutAIV* foram detectados, respectivamente, em 77,3%, 12,5%, 51%, 16,6% e 89,8% dos isolados de *S. mutans* considerados viáveis (N=392). A virulência do *S. mutans* apresentou associação com sua transmissão ($P<0,001$) e estabilidade ($P=0,011$), sendo que os genótipos mais virulentos apresentaram aproximadamente três vezes mais chance de serem transmitidos (OR=3,07; IC95% 2,02 - 4,66) e aproximadamente duas vezes mais chance de persistirem na cavidade bucal dos indivíduos (OR=2,06; IC95% 1,17 - 3,63) do que os menos virulentos. Apesar da prevalência dos genes *mutAI* ($P<0,001$) e *mutAIII* ($P<0,001$) terem sido diferentes entre os genótipos de *S. mutans* transmitidos e não transmitidos, não houve associação ($P=0,357$) entre a experiência de cárie dentária das crianças e a virulência dos genótipos adquiridos. Os resultados sugerem que os genótipos dotados de informação genética para sintetizar GbpA e mutacinas apresentam importante vantagem ecológica no processo de colonização por *S. mutans*, mantendo-se estáveis na microbiota bucal do hospedeiro e favorecendo a transmissão intrafamiliar.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*. Fatores de virulência. Transmissão. Cárie dentária.

ABSTRACT

Virulence factors of *Streptococcus mutans* and its relation to the persistence and transmission of genotypes among Brazilian family members

Streptococcus mutans (*S. mutans*) is the main etiologic agent in the development of dental caries and several studies about its virulence have been conducted to understand the mechanisms of disease pathogenesis. Among other factors, the virulence of this bacterial species is based on their ability to produce glucan-binding protein-A (GbpA) and mutacins, proteins that play an important role in cell adhesion and colonization of the dental surface. Thus, the aim of the present study was to analyze, genetically, these virulence factors of *S. mutans* and to investigate their relation with the persistence and transmission of genotypes among the members from eight Brazilian families. A total of 392 clinical isolates of *S. mutans*, collected from 20 caries-active adults, were utilized. These microorganisms were previously identified and genotyped in a study that evaluated their transmissibility and stability over time. The samples stored at -86°C were plated on different culture media (blood agar and Mitis Salivarius Sucrose Bacitracin agar) and grown in Brain Heart Infusion broth. After extraction of bacterial chromosomal DNA, the samples were amplified, by the technique of polymerase chain reaction, for the presence of genes coding for GbpA (*gbpA*) and for mutacins types I, II, III and IV (*mutAI*, *mutAII*, *mutAIII* and *mutAIV*). Data obtained were analyzed through descriptive and inferential statistics, using the Chi-Square, Odds Ratio (OR) and Fisher's exact tests, with a 95% confidence interval (95%CI) and a significance level of 5%. The *gbpA*, *mutAI*, *mutAII*, *mutAIII* and *mutAIV* genes were detected, respectively, in 77.3%, 12.5%, 51%, 16.6% and 89.8% of viable clinical isolates (N=392). The virulence of *S. mutans* was associated with the transmission ($P<0,001$) and stability of colonization ($P=0.011$). The most virulent genotypes showed approximately three times more likely to be transmitted (OR=3.07; 95%CI 2.02 - 4.66) and approximately two times more likely to persist in the oral cavity (OR=2.06; 95%CI 1.17 - 3.63) than the less virulent genotypes. Despite the prevalence of genes *mutAI* ($P<0.001$) and *mutAIII* ($P<0.001$) have been different between the genotypes of *S. mutans* transmitted and no transmitted, there was no association ($P=0.357$) between the experience of dental caries of children and the virulence of the acquired genotypes. The results suggest that the genotypes with genetic information to synthesize GbpA and mutacins can represent an important ecological advantage in the process of colonization by *S. mutans*, remaining stable in the oral microbiota of the host and favoring an intrafamilial transmission.

Keywords: *Streptococcus mutans*. Virulence factors. Transmission. Dental caries.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 -** Cultivo dos isolados bacterianos: Amostra de *S. mutans* congelada (a); Ágar MSBS (b); Semeadura em estria (c); Aspecto macroscópico das colônias após 72 horas (d)..... **73**
- Figura 2 -** Padrão morfológico de crescimento bacteriano encontrado nas amostras de *S. mutans* cultivados em ágar MSBS: Microscópio estereoscópio com aumento de 30X (a) e 50X (b). A seta indica gotícula cintilante de polissacarídeo extracelular no topo de uma colônia. Coloração de Gram: Microscópio óptico com objetiva de imersão 100X (c)..... **75**
- Figura 3 -** Repique das colônias de *S. mutans*: Caldo BHI com coloração original amarela e límpida (a); Seleção de uma colônia (b); Inoculação no meio de cultura líquido (c); Crescimento bacteriano (d). Observar aspecto turvo do conteúdo do tubo..... **77**
- Figura 4 -** Extração do DNA cromossômico bacteriano: *Kit* comercial utilizado (a); Criotubo contendo o crescimento bacteriano em caldo BHI (b); Centrifugação das amostras (c); Incubação em banho-maria (d); DNA extraído (e); Espectrofotômetro (f)..... **81**
- Figura 5 -** PCR e análise do DNA por eletroforese em gel de agarose: Reagentes da PCR (a); Montagem das placas com as misturas das reações (b); Termociclador (c); Carregamento no gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR (d); Corrida eletroforética (e); Sistema de fotodocumentação (f)..... **85**
- Figura 6 -** Eletroforese em gel de agarose 0,75% da amplificação por PCR do gene *gfpA* (2.100 pb) em *S. mutans* isolados dos membros da família 2. Coluna 1 - marcador de peso molecular de 250 pb; Coluna 2 - controle positivo da reação; Coluna 7 - controle negativo da reação; Colunas 3 a 6 - isolados da mãe; Colunas 8 e 9 - isolados do pai; Colunas 10 e 11 - isolados da avó..... **94**

-
- Figura 7 -** Eletroforese em gel de agarose 1,5% da amplificação por PCR dos genes *mutAI* (700 pb) e *mutAIII* (450 pb) em *S. mutans* isolados de membros de diferentes famílias. Coluna 1 - marcador de peso molecular de 250 pb; Colunas 2 e 3 - isolados da mãe da família 1; Colunas 4 e 5 - isolados da avó da família 1; Colunas 6 e 7 - isolados da mãe da família 2; Colunas 8 a 10 - isolados da avó da família 2..... **95**
- Figura 8 -** Eletroforese em gel de agarose 1,5% da amplificação por PCR do gene *mutAII* (444 pb) em *S. mutans* isolados dos membros da família 4. Coluna 1 - marcador de peso molecular de 250 pb; Coluna 2 - controle positivo da reação; Coluna 3 - controle negativo da reação; Colunas 4 a 7 - isolados da mãe; Colunas 8 a 10 - isolados do pai; Colunas 11 e 12 - isolados da avó..... **95**
- Figura 9 -** Eletroforese em gel de agarose 1,5% da amplificação por PCR do gene *mutAIV* (1.344 pb) em *S. mutans* isolados dos membros da família 7. Coluna 1 - marcador de peso molecular de 250 pb; Coluna 2 - controle positivo da reação; Coluna 3 - controle negativo da reação; Colunas 4 a 9 - isolados do pai; Colunas 10 a 12 - isolados da mãe..... **95**
- Figura 10 -** Eletroforese em gel de agarose 1,5% das amplificações por PCR dos cinco genes analisados em isolados de *S. mutans*. Coluna 1 - marcador de peso molecular de 250 pb; Coluna 2 - banda referente ao gene *mutAI* (700 pb); Coluna 4 - bandas referentes aos genes *mutAI* (700 pb) e *mutAIII* (450 pb); Coluna 6 - banda referente ao gene *mutAII* (444 pb); Coluna 8 - banda referente ao gene *mutAIV* (1.344 pb); Coluna 10 - banda referente ao gene *gbpA* (2.100 pb); Colunas 3, 5, 7, 9 e 11 - controles negativos das respectivas reações..... **96**

- GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição das amostras de <i>S. mutans</i> analisadas geneticamente, de acordo com sua origem (N=392).....	93
Gráfico 2 - Frequências absoluta e relativa (%) de detecção dos genes <i>gpbA</i> , <i>mutAI</i> , <i>mutAII</i> , <i>mutAIII</i> e <i>mutAIV</i> nas amostras estudadas (N=392).....	94

- QUADROS

Quadro 1 - <i>Primers</i> utilizados na análise genético-molecular do gene <i>gpbA</i>	83
Quadro 2 - <i>Primers</i> utilizados na análise genético-molecular dos genes <i>mutAI</i> , <i>mutAII</i> , <i>mutAIII</i> e <i>mutAIV</i>	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Caracterização dos indivíduos adultos pertencentes às oito famílias estudadas.....	70
Tabela 2 -	Distribuição por participante do número de amostras utilizadas no presente estudo (N=393).....	71
Tabela 3 -	Composição das classes de virulência de acordo com o número de isolados de <i>S. mutans</i> e combinações de genes detectados....	96
Tabela 4 -	Caracterização dos 24 diferentes genótipos de <i>S. mutans</i> detectados nas oito famílias estudadas.....	97
Tabela 5 -	Descrição dos 11 genótipos de <i>S. mutans</i> identificados como os mais virulentos.....	98
Tabela 6 -	Distribuição intrafamiliar dos genótipos de <i>S. mutans</i> no decorrer das visitas (Adaptada de Rubira, 2007).....	98
Tabela 7 -	Associação entre a virulência dos isolados de <i>S. mutans</i> e a transmissão, compartilhamento e estabilidade dos genótipos.....	99
Tabela 8 -	Distribuição, quanto à transmissibilidade, dos 24 diferentes genótipos de <i>S. mutans</i>	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-PCR	<i>Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase utilizando <i>Primers</i> Arbitrários)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção Americana de Tipos de Cultura)
ATP	Adenosina Trifosfato
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão de Cérebro e Coração)
ceo-d	Número de dentes decíduos cariados, com extração indicada ou extraídos e restaurados
ceo-s	Número de superfícies dentárias decíduas cariadas, com extração indicada ou extraídas e restauradas
CPI	Cárie Precoce da Infância
CPO-D	Número de Dentes Permanentes Cariados, Perdidos e Restaurados
CPO-S	Número de Superfícies Dentárias Permanentes Cariadas, Perdidas e Restauradas
DNA	<i>Desoxy-ribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Tri-Fosfatados
DP	Desvio Padrão
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)
EGM	Estreptococos do grupo <i>mutans</i>
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
GBP	<i>Glucan-Binding Protein</i> (Proteína Ligante de Glucano)
GbpA	Proteína Ligante de Glucano tipo A
GbpB	Proteína Ligante de Glucano tipo B
GbpC	Proteína Ligante de Glucano tipo C
GbpD	Proteína Ligante de Glucano tipo D
gbpA	Gene codificador da proteína ligante de glucano tipo A
gbpB	Gene codificador da proteína ligante de glucano tipo B
gbpC	Gene codificador da proteína ligante de glucano tipo C
gbpD	Gene codificador da proteína ligante de glucano tipo D

GTF	Glicosiltransferase
H₀	Hipótese Nula
HCl	Ácido Clorídrico
IC	Intervalo de Confiança
KCl	Cloreto de Potássio
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MLST	Multilocus Sequência de Digitação
MSBS	Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose
<i>mutAI</i>	Gene codificador da mutacina tipo I
<i>mutAII</i>	Gene codificador da mutacina tipo II
<i>mutAIII</i>	Gene codificador da mutacina tipo III
<i>mutAIV</i>	Gene codificador da mutacina tipo IV
OR	<i>Odds Ratio</i>
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PFGE	<i>Pulsed Field Gel electrophoresis</i> (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado)
qsp	Quantidade suficiente para
REA	<i>Restriction Endonuclease Analysis</i> (Análise por Enzima de Restrição)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase via Transcrição Reversa)
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
ST	Sequência Tipo
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USP	Universidade de São Paulo
V1	Primeira visita
V2	Segunda visita
V3	Terceira visita
V4	Quarta visita

LISTA DE SÍMBOLOS

®	marca registrada
°C	grau Celsius
µL	microlitro
C⁻	controle negativo
C⁺	controle positivo
kDa	kilodalton
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
N	número total
ng	nanograma
nm	nanômetro
<i>P</i>	significância estatística
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotação por minuto
U	unidade
V	volt

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>S. mutans</i>	31
2.1.1	Proteínas Ligantes de Glucano	32
2.1.1.1	Descoberta e estrutura da GbpA	32
2.1.1.2	Mecanismo de ligação ao glucano	32
2.1.1.3	Significado clínico da GbpA e regulação da expressão gênica	33
2.1.2	Mutacinas	37
2.1.2.1	Produção de mutacinas X cárie dentária	37
2.1.2.2	Produção de mutacinas X transmissibilidade de <i>S. mutans</i>	41
2.2	TRANSMISSÃO E ESTABILIDADE DE COLONIZAÇÃO DE <i>S. mutans</i>	43
3	PROPOSIÇÃO	63
4	MATERIAL E MÉTODOS	67
4.1	PROCEDIMENTOS ÉTICOS	69
4.2	LOCAIS DE EXECUÇÃO	69
4.3	ESTUDO PILOTO	69
4.4	AMOSTRA	69
4.5	ETAPAS LABORATORIAIS	71
4.5.1	Cultivo e Repique de <i>S. mutans</i>	71
4.5.2	Extração do DNA Bacteriano	79
4.5.3	Análises Genético-Moleculares dos Fatores de Virulência de <i>S. mutans</i>	83
4.5.3.1	Detecção do gene envolvido na produção de GbpA por <i>S. mutans</i>	83
4.5.3.2	Detecção dos genes envolvidos na produção de mutacinas por <i>S. mutans</i>	87
4.6	ANÁLISE DOS DADOS	88

5	RESULTADOS	91
6	DISCUSSÃO	101
7	CONCLUSÕES	113
	REFERÊNCIAS	117
	APÊNDICES	133
	ANEXOS	141

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Devido aos seus fatores de virulência, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) é considerado o microrganismo colonizador da cavidade bucal humana de maior cariogenicidade (HAMADA; SLADE, 1980; LOESCHE, 1986). Consequentemente, durante décadas, a comunidade científica tem se dedicado a investigá-lo por meio de diversas técnicas bioquímicas, sorológicas e genéticas (GUO et al., 2008).

A virulência do *S. mutans* está relacionada, dentre outros mecanismos, a sua habilidade em sintetizar proteínas ligantes de glucano (GBPs), um grupo heterogêneo de proteínas que promovem a adesão celular às superfícies dos dentes (RUSSELL, 1979; BANAS; VICKERMAN, 2003; MATSUMOTO-NAKANO; FUJITA; OOSHIMA, 2006; HOSHINO; FUJIWARA; KAWABATA, 2012). Seu completo significado biológico permanece indefinido, mas sabe-se que as mesmas influenciam a manutenção da arquitetura do biofilme dentário pela união da bactéria com moléculas extracelulares de glucano (LYNCH et al., 2007).

Até o presente momento, foram purificados quatro tipos diferentes de GBPs, designadas GbpA (RUSSELL, 1979), GbpB (SMITH et al., 1994), GbpC (SATO; YAMAMOTO; KIZAKI, 1997) e GbpD (SHAH; RUSSELL, 2004), de acordo com a ordem de sua descoberta. Simultaneamente à divulgação desses achados ou em estudos posteriores, os genes codificadores das respectivas proteínas, *gbpA* (BANAS; RUSSELL; FERRETTI, 1990), *gbpB* (MATTOS-GRANER et al., 2001b), *gbpC* (SATO; YAMAMOTO; KIZAKI, 1997) e *gbpD* (SHAH; RUSSELL, 2004) foram sendo clonados e sequenciados.

A GbpA (59 kDa) é uma proteína secretada que contém o domínio ligante de glucano (carboxiterminal) com repetições de aminoácidos semelhantes às glicosiltransferases (GTFs) de *S. mutans* e de outros estreptococos bucais (BANAS; RUSSELL; FERRETTI, 1990). Seu efeito parece ser dependente da quantidade de glucano disponível no ambiente (BANAS et al., 2007), contribuindo para a cariogenicidade de *S. mutans* ao desempenhar importante papel na adesão e coesão bacteriana durante a formação do biofilme dentário (RUSSELL; DONALD; DOUGLAS, 1983; HAZLETT; MICHALEK; BANAS, 1998; HAZLETT; MAZURKIEWICZ; BANAS, 1999; MATSUMURA et al., 2003). Tal característica a

destaca das demais GBPs, o que norteou a opção de analisá-la geneticamente no presente estudo.

Imunologicamente distinta das outras GBPs expressas por *S. mutans*, a GbpB (41,3 kDa) pode ser encontrada em associação com a superfície celular ou difusa no meio extracelular (SMITH et al., 1994). Em virtude de suas propriedades imunodominantes, é considerada a única GBP capaz de induzir uma resposta imune protetora contra a cárie dentária em modelos experimentais (SMITH; TAUBMAN, 1996; SMITH; KING; GODISKA, 2001; SMITH; MATTOS-GRANER, 2008). Sua produção está relacionada à capacidade de formação de biofilmes *in vitro* (MATTOS-GRANER et al., 2001b), atuando possivelmente como parte de um complexo de proteínas envolvidas na síntese e estabilidade da parede celular bacteriana (FUJITA et al., 2007; MATSUMOTO-NAKANO; FUJITA; OOSHIMA, 2007; DUQUE et al., 2011).

A GbpC (63,5 kDa) é uma proteína ancorada à parede celular de *S. mutans*, cuja expressão parece ser mais intensa sob condições de estresse ambiental (SATO; YAMAMOTO; KIZAKI, 1997; SATO; YAMAMOTO; KIZAKI, 2000). Sua atividade está associada com o processo de agregação dextrano-dependente, funcionando como um receptor de superfície para o glucano sintetizado pelas GTFs (MA et al., 1996; SATO; YAMAMOTO; KIZAKI, 1997; MATSUMOTO-NAKANO; FUJITA; OOSHIMA, 2006).

Assim como a GbpA, a GbpD (76 kDa) compartilha homologia em seus domínios ligantes de glucano com os domínios das GTFs. Essa proteína secretada apresenta provável função na agregação e adesão das bactérias às superfícies lisas dos dentes. Ademais, sua eminente atividade de lipase sugere a possibilidade de estar envolvida em uma competição direta entre espécies da microbiota bucal (SHAH; RUSSELL, 2004).

Durante a formação do biofilme dentário, um dos primeiros mecanismos utilizados por algumas cepas bacterianas, para tentar estabelecer a colonização de um nicho específico, é a liberação de proteínas antimicrobianas chamadas bacteriocinas (HAMADA; OOSHIMA, 1975). Apesar de apresentarem diferentes atividades e padrões estruturais, elas preservam propriedades físico-químicas em comum. No geral, são proteínas catiônicas e hidrofóbicas, constituídas por 20 a 60

resíduos de aminoácidos que atuam formando poros na membrana citoplasmática celular ou reduzindo o metabolismo da bactéria susceptível (NES; HOLO, 2000).

As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas são caracterizadas em duas classes: os lantibióticos (proteínas que sofrem modificação pós-traducional e contêm resíduos de aminoácidos desidratados, lantionina e/ou β -metil-lantionina) e os não-lantibióticos (proteínas não modificadas) (SAHL; JACK; BIERBAUM, 1995; SAHL; BIERBAUM, 1998). Esses pequenos peptídeos são uma relevante ferramenta na competição entre os estreptococos bucais, apresentando efeito bactericida principalmente contra linhagens da mesma espécie ou estreitamente relacionadas (PARROT; CAUFIELD; LAVOIE, 1990; NES; HOLO, 2000; BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2001).

O termo “mutacinas” foi introduzido por Hamada e Ooshima (1975) e refere-se às bacteriocinas sintetizadas por *S. mutans*. Elas representam um importante fator de virulência relacionado com o risco de cárie dentária (KURAMITSU, 1993; GRÖNROOS et al., 1998; NAPIMOGA et al., 2004). A capacidade de uma cepa bacteriana produzir mutacinas interfere na invasão e proliferação de outras bactérias no biofilme, aumentando seu potencial cariogênico e conferindo significativa vantagem ecológica para a cepa produtora (ROGERS; van der HOEVEN; MIKX, 1979; HILLMAN; JOHNSON; YAPHE, 1984; BALAKRISHNAN et al., 2002; KRETH et al., 2006; NICOLAS; LAVOIE; LAPOINTE, 2007; NGUYEN et al., 2009; KAMYIA; TAIETE; GONÇALVES, 2011).

Com base na sua atividade bactericida, foram identificados quatro tipos principais de mutacinas, as quais são codificadas pelos genes estruturais *mutAI* (QI; CHEN; CAULFIELD, 2000), *mutAII* (NOVÁK; CAUFIELD; MILLER, 1994), *mutAIII* (QI; CHEN; CAULFIELD, 1999) e *mutAIV* (QI; CHEN; CAULFIELD, 2001). A mutacina tipo I (CAULFIELD et al., 1985) induz a formação de poros na membrana citoplasmática e, deste modo, mata os competidores sensíveis por rompimento e, consequente, perda de componentes intracelulares (CHIKINDAS et al., 1995; SAHL; JACK; BIERBAUM, 1995; ASADUZZAMAN; SONOMOTO, 2009). Sua produção é rigorosamente controlada por mecanismos regulatórios (TSANG et al., 2005) e pode ser desencadeada diante de uma densa e complexa colonização do biofilme. Isso sugere que sua atuação seja, predominantemente, nas etapas tardias de infecção

por *S. mutans* (QI; CHEN; CAULFIELD, 2001; KAMYIA; TAIETE; GONÇALVES, 2011).

O mais amplo espectro de atividade mutacinolítica (PARROT; CAUFIELD; LAVOIE, 1990) é atribuído à mutacina tipo II (CAULFIELD et al., 1985). Essa proteína é termoestável e biologicamente ativa sob uma vasta gama de valores de pH (4 a 10) (NOVÁK; CAUFIELD; MILLER, 1994), afetando o nível energético celular pela inibição de funções enzimáticas essenciais à geração de energia metabólica. Seu mecanismo de ação inclui a despolarização transitória do potencial elétrico e do gradiente de pH transmembrana, bem como o esgotamento do estoque intracelular de ATP, causando a morte bacteriana sem lise visível (CHIKINDAS et al., 1995).

A mutacina tipo III (QI; CHEN; CAULFIELD, 1999) é ativa especialmente contra patógenos resistentes a medicamentos, entre eles: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina e *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina. Essa bacteriocina, juntamente com os tipos I e II de mutacinas, pertencem à classe dos lantibióticos e apresentam potencial para serem utilizadas em terapias antibióticas devido ao seu amplo espectro de ação contra patógenos Gram positivos (PARROT; CAUFIELD; LAVOIE, 1990).

A representante da classe dos não-lantibióticos é a mutacina tipo IV (QI; CHEN; CAULFIELD, 2001). Ela atua inibindo o crescimento dos colonizadores primários da superfície dentária (estreptococos bucais do grupo *mitis*) favorecendo, desta forma, a instalação de *S. mutans* (QI; CHEN; CAULFIELD, 2001; HALE et al., 2005; KAMYIA et al., 2005a; KRETH et al., 2005a, 2005b; HOSSAIN; BISWAS, 2011; LIU et al., 2013). Acredita-se que a adsorção das moléculas de proteína à superfície bacteriana, por meio de receptores específicos, seria o fator responsável pelo seu espectro de ação relativamente reduzido (WU; YIN; JIANG, 2004; MERRITT; QI, 2012).

A microbiota cariogênica é transmitida por meio do contato frequente entre os indivíduos, sendo a saliva o seu principal veículo (CAUFIELD; WALKER, 1989). O caráter de transmissibilidade de *S. mutans* foi descrito primeiramente por Keyes (1960) e permanece sendo investigado por diversos grupos de pesquisadores ao longo dos anos. Visto que as crianças são mais propensas a serem contaminadas durante seus primeiros anos de vida (ALALUUSUA, 1991), a

identificação das fontes de transmissão de *S. mutans* é vista como essencial para o desenvolvimento de estratégias para a prevenção da cárie dentária (KLEIN et al., 2004; NAPIMOGA et al., 2005; BERKOWITZ, 2006; BACA et al., 2012).

Estudos realizados com diferentes técnicas de tipagem bacteriana apontam a transmissão vertical intrafamiliar dos pais para os filhos como via primária de infecção por *S. mutans*, ao mesmo tempo que indicam a mãe como principal, mas não exclusiva, fonte de contaminação precoce (BERKOWITZ; JORDAN, 1975; ROGERS, 1981; DAVEY; ROGERS, 1984; BERKOWITZ; JONES, 1985; CAUFIELD; WALKER, 1989; KULKARNI; CHAN; SANDHAM, 1989; AZEVEDO; ZELANTE, 1994; LI; CAUFIELD, 1995; ALALUUSUA et al., 1996; GRÖNROOS et al., 1998; REDMO EMANUELSSON; LI; BRATTHALL, 1998; REDMO EMANUELSSON; WANG, 1998; KOZAI et al., 1999; LI; WANG; CAUFIELD, 2000; REDMO EMANUELSSON; THORNQVIST, 2000; VAN LOVEREN; BUIJS; TEN CATE, 2000; TEDJOSASONGKO; KOZAI, 2002; KÖHLER et al., 2003; SPOLIDORIO et al., 2003; ERSIN et al., 2004; KLEIN et al., 2004; LINDQUIST; EMILSON, 2004; FIGUEIREDO; CRUZ; CAUFIELD, 2005; LI, S et al., 2005; LI, Y et al., 2005; RUBIRA, 2007; HAMEŞ-KOCABAŞ et al., 2008; LAPIRATTANAKULL et al., 2008; ALVES et al., 2009; MITCHELL et al., 2009; CARLETTO-KÖRBER et al., 2010; TEANPAISAN et al., 2012; ZHAN et al., 2012). No decorrer dos anos, também tem sido relatada uma rota adicional de aquisição desses patógenos. O compartilhamento de genótipos idênticos de *S. mutans* suporta evidências de transmissão horizontal entre cônjuges (ROGERS, 1981; DAVEY; ROGERS, 1984; KULKARNI; CHAN; SANDHAM, 1989; SAARELA et al., 1993; AZEVEDO; ZELANTE, 1994; REDMO EMANUELSSON; WANG, 1998; KOZAI et al., 1999; VAN LOVEREN; BUIJS; TEN CATE, 2000; NIE; FAN; BIAN, 2002; KÖHLER et al., 2003; ERSIN et al., 2004; RUBIRA, 2007), entre irmãos (KULKARNI; CHAN; SANDHAM, 1989; AZEVEDO; ZELANTE, 1994; KOZAI et al., 1999; KÖHLER et al., 2003; SPOLIDORIO et al., 2003; MITCHELL et al., 2009) e entre crianças não relacionadas geneticamente (MATTOS-GRANER et al., 2001a; TEDJOSASONGKO; KOZAI, 2002; LIU et al., 2007; ALVES et al., 2009; DOMÉJEAN et al., 2010; BACA et al., 2012).

Uma possível influência dos fatores de virulência, como a produção de mutacinas, no processo de transmissão de *S. mutans* não está suficientemente apoiada em relatos disponíveis na literatura. Trabalhos baseados em análises

fenotípicas revelaram resultados controversos. Enquanto Grönroos et al. (1998) e Zhan et al. (2012) sugeriram que as cepas bacterianas com amplo espectro inibitório seriam transmitidas mais facilmente das mães para seus filhos; van Loveren, Buijs e ten Cate (2000) não encontraram relação entre a atividade mutacínolítica de *S. mutans* e um aumento na probabilidade de transmissão intrafamiliar. Dentro desse contexto, Li, S et al. (2005) perceberam a necessidade de uma avaliação mais sensível e específica; então, analisaram os elementos genéticos responsáveis pela produção de diferentes tipos de mutacinas e verificaram redução na transmissibilidade das cepas de *S. mutans* portadoras do gene *mutAI*.

Ao longo da vida, alguns genótipos de *S. mutans* podem persistir na cavidade bucal humana ou serem detectados transitoriamente, refletindo o desenvolvimento contínuo dessa microbiota (KLEIN et al., 2004). Atualmente, sabe-se que a estabilidade de colonização de uma cepa bacteriana está associada não somente a sua capacidade de aderência e crescimento, mas também a sua habilidade em superar diferentes situações de estresse (BOWDEN; HAMILTON, 1998).

A literatura reporta acompanhamentos longitudinais os quais identificaram genótipos de *S. mutans* estáveis na cavidade bucal de adultos e crianças, mas não relacionaram sua virulência com a persistência de genótipos no decorrer do tempo (ROGERS, 1975; DAVEY; ROGERS, 1984; KULKARNI; CHAN; SANDHAM, 1989; KOZAI et al., 1991; ALALUUSUA et al., 1994; REDMO EMANUELSSON; THORNQVIST, 2000; KÖHLER et al., 2003; REDMO EMANUELSSON et al., 2003; KLEIN et al., 2004; LINDQUIST; EMILSON, 2004; LIU et al., 2004; ALVES et al., 2009; TEANPAISAN et al. 2012). Assim sendo, estudos sobre os fatores de virulência de *S. mutans* e sua correlação com a biodiversidade da espécie são fundamentais para compreender a colonização da cavidade bucal por diferentes genótipos e sua capacidade de sobreviver sob condições ambientais variadas (NAPIMOGA et al., 2005).

Entre os anos de 2001 e 2005, um grandioso projeto multicêntrico foi desenvolvido pela Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo (FOB/USP) em convênio com a Universidade de Pittsburgh/USA. A referida parceria originou, dentre outras produções, a tese de Doutorado intitulada “Estudo longitudinal sobre similaridade, transmissão e estabilidade de colonização de

Streptococcus mutans em famílias brasileiras” (RUBIRA, 2007). Nesta pesquisa, observou-se que dentro das famílias, nem todos os genótipos de *S. mutans* detectados nos indivíduos adultos mantiveram-se estáveis ao longo do tempo e implantaram-se na cavidade bucal das crianças. A partir dessas constatações preliminares e com base no questionamento “Por que alguns genótipos de *S. mutans* persistem na cavidade bucal ou são transmitidos/compartilhados melhor do que outros?”, o presente estudo visa contribuir para o preenchimento de lacunas literárias ao relacionar, geneticamente, os achados da pesquisa inicial com alguns fatores de virulência de *S. mutans*.

A realização desta investigação complementar se justifica por buscar tanto a detecção de isolados de *S. mutans* portadores dos genes *gbpA*, *mutAI*, *mutAII*, *mutAIII* e *mutAIV*, quanto a identificação dos genótipos com potencial de serem colonizadores mais virulentos e, conseqüentemente, os indivíduos por eles colonizados. De acordo com a hipótese da transmissão, compartilhamento e/ou persistência de tais genótipos e considerando a importância do reconhecimento precoce de populações de risco à cárie dentária, espera-se entender melhor determinadas circunstâncias que possam interferir ou colaborar para o sucesso da colonização por um genótipo específico de *S. mutans* e, desta forma, obter subsídios que auxiliem o planejamento e implantação de estratégias educativo-preventivas direcionadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *S. mutans*

O termo "fator de virulência" significa qualquer componente ou substância produzida por um microrganismo capaz de potencializar ou provocar doença em um hospedeiro (SCHAECHTER et al., 1999). Os fatores de virulência de *S. mutans* são determinados geneticamente, porém expressos pelos microrganismos quando submetidos a determinadas condições de estresse ambiental. Eles protegem a bactéria contra possíveis mecanismos de defesa do hospedeiro e ajudam a manter seu nicho ecológico na cavidade bucal (AJDIĆ et al., 2002).

Capacidade de adesão, acidogenicidade, tolerância ácida ou aciduricidade e produção de mutacinas são os principais fatores de virulência associados à cariogenicidade de *S. mutans* (HAMADA; OOSHIMA, 1975; HAMADA; SLADE, 1980; KURAMITSU, 1993; BANAS, 2004). Cada uma dessas propriedades atua coordenadamente visando alterar a ecologia do biofilme dentário por meio do aumento nas proporções de espécies cariogênicas. A seleção de uma microbiota bacteriana cariogênica provoca diminuição do pH do biofilme, seguida de fermentação dos carboidratos disponíveis, aumentando a probabilidade de desmineralização do esmalte dentário e o início das lesões de cárie dentária (LOESCHE, 1986; BANAS, 2004).

A adesão de *S. mutans* às superfícies dos dentes pode ocorrer tanto na presença quanto na ausência de carboidratos fermentáveis. O mecanismo de aderência sacarose dependente é mediado pela atividade enzimática das GTFs, as quais participam da síntese de polissacarídeos extracelulares, os glucanos, a partir de moléculas de sacarose (LOESCHE, 1986; KURAMITSU, 1993; YAMASHITA et al., 1993). Nas etapas subsequentes de desenvolvimento do biofilme e agregação celular, a produção de GBPs tem papel de destaque. Por serem proteínas extracelulares, normalmente associadas à parede celular de *S. mutans*, acredita-se que contribuam para o acúmulo bacteriano na presença de sacarose, formando uma ponte que une as superfícies celulares dos microrganismos à matriz extracelular de glucanos (BANAS; VICKERMAN, 2003; BANAS, 2004).

2.1.1 Proteínas Ligantes de Glucano

Os tópicos abordados nessa subsecção serão restritos à GbpA, um dos objetos de estudo da presente pesquisa.

2.1.1.1 Descoberta e estrutura da GbpA

A GbpA foi originalmente isolada por Russell (1979) a partir do fluido extracelular de culturas de *S. mutans* sorotipo *c* e denominada genericamente de GBP. Alguns anos depois, Smith et al. (1994) relataram a descoberta de uma nova GBP; e a primeira proteína identificada recebeu a denominação de GbpA.

Em 1990, Banas, Russell e Ferretti sequenciaram o gene *gbp* e, considerando o ponto de clivagem do peptídeo sinal, determinaram que o tamanho da proteína GBP (59 kDa) era menor do que aquele estimado por Russell (1979) (74 kDa), utilizando-se a eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio¹. Paralelamente, os mesmos autores detectaram na estrutura proteica alta homologia com o domínio carboxiterminal das GTFs. Esses domínios consistem de 21 unidades de aminoácidos repetidos e são denominados YG devido à presença de um ou mais resíduos de tirosina no início da repetição e uma glicina altamente conservada na posição intermediária (GIFFARD; JACQUES, 1994).

2.1.1.2 Mecanismo de ligação ao glucano

Desde sua descoberta, ficou bem estabelecido na literatura que o domínio carboxiterminal da GbpA é capaz de se ligar às ligações glicosídicas alfa-1,6 dos dextranos (glucanos solúveis em água) e mutanos (glucanos insolúveis em água) (RUSSELL, 1979). Com o passar do tempo, questões relativas à afinidade de

¹ Técnica de eletroforese que permite a separação de proteínas por aplicação de um campo elétrico ao gel de poliacrilamida acrescido do detergente aniônico dodecil sulfato de sódio. A identificação das proteínas ocorre pela migração das moléculas em uma direção e a uma velocidade que refletem sua dimensão (peso molecular) e carga global (WEBER; OSBORN, 1969).

ligação e ao papel das unidades de repetição YG permaneceram ignoradas e, então, alguns trabalhos foram realizados a fim de esclarecê-las.

Haas, MacColl e Banas (1998) utilizando uma análise de dicroísmo circular² detectaram elevada porcentagem de folhas beta e ausência de alfa hélices na estrutura do domínio carboxiterminal da GbpA. Os autores observaram que as folhas beta sofrem desdobramento e formam um núcleo hidrofóbico com domínio externo que interage com o glucano. Essa flexibilidade, portanto, facilitaria a ligação da proteína tanto aos glucanos solúveis quanto aos insolúveis.

No ano de 2000, por meio de eletroforese capilar de afinidade³ e precipitação proteica com polietilenoglicol⁴, Haas e Banas (2000) constataram que as repetições YG representam a totalidade dos domínios ligantes da GbpA e que os mesmos possuem, no mínimo, 100 vezes maior afinidade por dextranos do que por mutanos. A deleção de repetições YG provocou a formação de alfa hélices ao invés de folhas beta, afetando a estrutura terciária da proteína e reduzindo substancialmente sua capacidade de ligação ao glucano.

2.1.1.3 Significado clínico da GbpA e regulação da expressão gênica

GbpAs são proteínas constitutivamente expressas (BANAS; POTVIN; SINGH, 1997). Existem evidências de que sua expressão seria regulada pelo gene *gbpA*, mas a base genética desse mecanismo é pouco conhecida (BANAS; VICKERMAN, 2003). Experimentos envolvendo a deleção do gene *gbpA* mostraram a contribuição dessa proteína, sobretudo na aderência sacarose-dependente de *S. mutans* e na coesão do biofilme dentário. Entretanto, conforme será relatado a seguir, diversos estudos utilizando mutantes nulos de *gbpA* apresentam conclusões divergentes acerca da natureza dessa influência.

² Espectroscopia rotineiramente utilizada no estudo da estrutura secundária de proteínas que faz uso da absorbância diferencial da luz polarizada no sentido horário e no sentido anti-horário (FASMAN, 1996).

³ Técnica eletroforética baseada na separação em capilares de substâncias que participam de interações bioespecíficas entre o analito (parte da amostra que é o foco da análise química) e o ligante de afinidade (HEEGAARD; NILSSON; GUZMAN, 1998).

⁴ Etapa preliminar de purificação proteica que compreende a modificação da estrutura tridimensional da molécula de proteína pela adição do polietilenoglicol à solução. Este polímero não-iônico hidrossolúvel reduz a solubilidade da molécula alvo e provoca a precipitação fracionada da proteína (NAVA et al., 2005).

Russell, Donald e Douglas (1983) geraram quimicamente uma cepa mutante deficiente na produção de GbpA e analisaram sua capacidade de adesão *in vitro*. A cepa de *S. mutans* estudada reduziu a aderência dependente de sacarose e formou um biofilme fragilmente aderido à superfície do vidro. Os autores acreditam que esse resultado seja uma evidência da contribuição da GbpA para a coesividade do acúmulo bacteriano, desde que os mutantes com ausência da proteína não conseguiram formar um biofilme coeso.

Uma vez que a GbpA está envolvida na colonização de *S. mutans* dependente da sacarose, seria concebível que sua expressão fosse induzida pela presença do referido carboidrato. Para testar essa hipótese, Banas, Potvin e Singh (1997) mensuraram a transcrição da região promotora do gene *gbpA* por meio de sua fusão genética com o gene repórter codificador da enzima cloranfenicol acetiltransferase. Os resultados apontaram que apesar da expressão de GbpA ser otimizada sob condições ambientais de anaerobiose e pH neutro, a mesma não é influenciada pela adição de sacarose ao meio de crescimento.

Em 1998, Hazlett, Michalek e Banas demonstraram pela primeira vez, em modelo animal, a influência direta de uma GBP na virulência de *S. mutans*. O estudo comparou as propriedades de aderência e cariogenicidade de mutantes nulos de *gbpA* em relação a um tipo selvagem de *S. mutans*. Contrariando as expectativas, as cepas mutantes exibiram maior aderência sacarose dependente *in vitro* e maior cariogenicidade *in vivo* do que o tipo selvagem. Foi proposto que a inativação do gene *gbpA* aumentaria a virulência das cepas mutantes em virtude de uma alteração estrutural no biofilme dentário. A presença de maior porosidade facilitaria o fluxo de nutrientes para os níveis mais profundos do biofilme, permitindo a geração contínua de ácido e, conseqüentemente, um microambiente cariogênico.

No ano seguinte, Hazlett, Mazurkiewicz e Banas (1999) complementaram o estudo anterior utilizando um modelo de biofilme dentário *in vitro* para testar a hipótese de que a ausência de GbpA realmente altera sua estrutura. A inativação do gene *gbpA* comprovou a ocorrência de modificações na arquitetura do biofilme, aumentando a virulência da cepa bacteriana. Os mutantes nulos de *gbpA* formaram um coeso biofilme composto por numerosos e pequenos agregados de *S. mutans*, os quais revestiam uniformemente o substrato subjacente. Os autores acreditam que essa barreira seria capaz de expor os

microrganismos aos carboidratos disponíveis e, assim, incrementar a produção de ácidos próximo ao esmalte dentário.

Questionamento similar sobre o mecanismo de participação da GbpA na virulência de *S. mutans* foi suscitado pelo estudo de Mattos-Graner et al. (2001b). Por intermédio de ensaios imunológicos de *dot blot*⁵ com anticorpos policlonais, os pesquisadores quantificaram a produção de GbpA e GbpB por isolados clínicos de *S. mutans*. Contrariando o observado em relação à GbpB, não houve associação significativa entre o crescimento na forma de biofilme *in vitro* e a quantidade de GbpA produzida no meio de cultura.

Matsumura et al. (2003) estudaram em modelo animal o papel *in vivo* das GBPs na virulência de *S. mutans*. Os genes codificadores das proteínas GbpA e GbpC foram inativados pela inserção de genes resistentes a antibióticos, gerando mutantes nulos de *gbpA* e *gbpC*. A aderência dependente de sacarose e a indução de cárie dentária pelas cepas mutantes foram significativamente inferiores às produzidas por um tipo selvagem de *S. mutans*. Baseados nesses resultados, os autores sugeriram que ambas as GBPs participam da adesão bacteriana às superfícies dentárias e contribuem para a cariogenicidade de *S. mutans*.

Por meio de diversas abordagens metodológicas, Mattos-Graner et al. (2006) realizaram uma análise funcional da GbpB sintetizada por *S. mutans*. Foram utilizadas análises de *Northern blot*⁶ para verificar a expressão do gene *gbpB* na presença de alta concentração de sal e baixo pH. O gene *gbpA* foi usado como controle negativo e, ao contrário do *gbpB*, não teve sua expressão influenciada pelas condições de estresse avaliadas.

Matsumoto-Nakano, Fujita e Ooshima (2006) examinaram *in vitro* o papel das GBPs na aderência sacarose dependente de *S. mutans*, utilizando cepas mutantes deficientes na produção de GbpA, GbpC, GTFB, GTFC e GTFD. Conforme esperado, reduções significativas na adesão celular às superfícies de

⁵ Método de hibridização utilizado para detecção de RNA, DNA ou proteínas em uma solução. Baseia-se na aplicação dos antígenos a serem detectados diretamente, sob a forma de ponto, em uma membrana de nitrocelulose, sem separação prévia por eletroforese (STOTT, 2000).

⁶ Técnica de biologia molecular utilizada para estudar a expressão gênica pela detecção de RNA em uma amostra. Envolve o uso de eletroforese para separar as moléculas de RNA e posterior identificação com uma sonda de hibridização complementar à sequência-alvo (STOTT, 2000).

vidro foram encontradas em todas as cepas estudadas. Além disso, somente o mutante nulo de *gbpA* e um tipo selvagem de *S. mutans* exibiram aumento na aderência dependente de sacarose após adição de GTFD à mistura da reação.

Em outro estudo, Matsumoto-Nakano, Fujita e Ooshima (2007) construíram geneticamente mutantes nulos de *gbpA*, *gbpB* e *gbpC* e compararam, *in vitro*, suas propriedades cariogênicas com as de um tipo selvagem de *S. mutans*. O mutante deficiente de GbpA apresentou atividades inferiores de ligação ao glucano solúvel, aderência sacarose dependente, expressão de GTFs e tolerância ácida. Com base nesses e em outros resultados, sugeriu-se que tanto a GbpA quanto a GbpC possuem fortes relações com a cariogenicidade de *S. mutans*, enquanto que a GbpB aparenta desempenhar função biológica adicional, em virtude da menor sobrevivência bacteriana sob condições ambientais de pH baixo.

A fim de entender melhor a contribuição das GBPs para o potencial patogênico de *S. mutans*, Lynch et al. (2007) projetaram mutantes nulos de *gbpA*, *gbpC* e *gbpD*, e examinaram, por microscopia confocal, o efeito específico dessas mutações na estrutura do biofilme dentário. Na ausência de sacarose as cepas mutantes deficientes na produção de GBPs e um tipo selvagem de *S. mutans* formaram um biofilme dentário mais escasso, com células espalhadas individualmente ou formando pequenos agregados sobre o substrato. Diferenças estruturais, como alterações da biomassa, da espessura e/ou da superfície total foram detectadas somente nos biofilmes sacarose dependentes. Os autores concluíram que cada GBP possui uma contribuição única para o desenvolvimento de um biofilme maduro e que a GbpA funcionaria como um andaime capaz de permitir que *S. mutans* construa um biofilme para fora do substrato dentário.

2.1.2 Mutacinas

2.1.2.1 Produção de mutacinas X cárie dentária

Os trabalhos descritos a seguir avaliaram a relação entre as mutacinas e a experiência de cárie dentária utilizando métodos moleculares isolados ou associados à bacteriocinotipagem⁷.

Qi, Chen e Caufield (2001) pesquisaram, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR)⁸, a presença do gene codificador da mutacina IV em isolados clínicos de *S. mutans*. Os autores obtiveram resultados positivos em mais de 50% das amostras analisadas e sugeriram que diferentes mutacinas poderiam servir para finalidades distintas durante o processo de colonização por *S. mutans*.

Devido à escassez de informações acerca da prevalência dos genes estruturais *mutA* em isolados clínicos de *S. mutans*, Longo, Mattos-Graner e Mayer (2003) realizaram reações de PCR a fim de detectar a presença dos genes codificadores das mutacinas tipos I, II e III em 19 cepas de *S. mutans* (11 isoladas de crianças cárie-ativas e oito de crianças livres de cárie). As amostras foram genotipadas pela reação em cadeia da polimerase utilizando *primers* arbitrários (AP-PCR)⁹ e investigadas por mutacinotipagem¹⁰, quanto à produção e sensibilidade às mutacinas. Apenas um isolado de *S. mutans* (12,5%) obtido de uma criança livre de cárie, amplificou o gene *mutAII* e nenhuma amostra testada, de ambos os grupos, apresentou sequência homóloga aos genes *mutAI* e *mutAIII*. Todos os isolados genotipados exibiram, fenotipicamente, atividade mutacinolítica contra no mínimo uma das 30 cepas indicadoras testadas. Entretanto, não foi observada relação entre grau de similaridade genética, espectro inibitório da cepa e experiência de cárie

⁷ Método fenotípico de tipagem bacteriana que permite agrupar cepas com perfis similares de produção de bacteriocinas frente a um conjunto de cepas indicadoras e/ou de sensibilidade a diferentes substâncias inibitórias (KELSTRUP et al., 1970).

⁸ Técnica de biologia molecular que permite a amplificação gênica de uma sequência pré-determinada a partir de pequena quantidade de DNA. Baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores específicos, *primers*, os quais delimitam a sequência de DNA alvo da amplificação (ESTRELA, 2005).

⁹ Método de detecção de variabilidade genética na sequência de DNA que propicia a identificação do grau de similaridade entre genótipos. A técnica é baseada na utilização, ao acaso, de *primers* para amplificar o DNA genômico e gerar fragmentos não específicos (ESTRELA, 2005).

¹⁰ Denominação designada à bacteriocinotipagem de EGM.

dentária da criança. Com base nesses resultados, os autores relataram que a produção de mutacinas pode não ser relevante para a capacidade da bactéria colonizar o hospedeiro e induzir a doença.

Kamiya et al. (2005b) avaliaram a relação entre diversidade genética e produção de mutacinas em 319 isolados clínicos de *S. mutans*, sendo 141 provenientes de oito indivíduos adultos cárie-ativos e 178 de oito indivíduos adultos livres de cárie. A mutacinotipagem identificou 48 diferentes fenótipos de *S. mutans* produtores de mutacinas enquanto que a genotipagem, pela AP-PCR, detectou 101 genótipos distintos. Cerca de 75% das amostras produziram mutacinas contra no mínimo uma das 12 cepas indicadoras utilizadas. Os resultados também revelaram que os isolados de *S. mutans* obtidos dos indivíduos cárie-ativos apresentaram maior produção de mutacinas e amplo espectro inibitório. Genótipos idênticos não apresentaram o mesmo perfil de produção de mutacinas, indicando que os padrões de espectros inibitórios produzidos por distintos genótipos de *S. mutans* são independentes do grau de similaridade genética entre as cepas bacterianas.

Dando seguimento ao trabalho anterior, Kamiya et al. (2005a) analisaram, por PCR, a frequência de detecção dos genes que codificam as mutacinas tipos I, II, III e IV e compararam com os perfis fenotípicos dessas substâncias *in vitro*. Um total de 63 isolados clínicos de *S. mutans* foram previamente fenotipados por mutacinotipagem (KAMYIA et al., 2005b) e genotipados pela AP-PCR (NAMPIMOGA et al., 2004). Assim, a amostra total foi constituída por 41 genótipos de *S. mutans* isolados de oito indivíduos adultos livres de cárie e por 22 genótipos isolados de oito indivíduos adultos cárie-ativos. Não foi evidenciada a presença do gene codificador da mutacina II nas amostras testadas. No grupo livre de cárie, 31,8% dos genótipos foram positivos para a mutacina IV e nenhum para as mutacinas I/III. No grupo cárie-ativo, houve amplificação dos genes da mutacina IV e das mutacinas I/III em, respectivamente, 68,3% e 41,5% dos genótipos. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre o número de genótipos positivos para a mutacina IV e a experiência de cárie dentária, sendo maior a frequência de detecção do gene *mutA/IV* nos indivíduos cárie-ativos. Em ambos os grupos, alguns genótipos produziram mutacina e mostraram atividade inibitória *in vitro* contra ao menos uma das 12 cepas indicadoras testadas, mas não amplificaram os genes

correspondentes. Por outro lado, no grupo cárie-ativo, alguns genótipos positivos para os genes das mutacinas I/III e IV não apresentaram atividade inibitória.

Um dos objetivos do estudo elaborado por Kreth et al. (2005b) foi analisar a prevalência dos genes das mutacinas I e IV em isolados clínicos de *S. mutans*. *Primers* específicos foram utilizados para amplificar, por PCR, o DNA cromossômico de 70 amostras bacterianas. Enquanto que o gene codificador da mutacina tipo IV foi detectado em aproximadamente 50% dos isolados de *S. mutans*, apenas uma pequena porcentagem (>5%) foi positiva para ambas as mutacinas I e IV. Segundo os autores, os resultados em conjunto demonstram uma relação entre a produção de mutacina IV por *S. mutans* e o desenvolvimento da competência celular, onde a ocorrência coordenada desses eventos atenderia ao propósito de adquirir o DNA de outras espécies de estreptococos bucais.

Kamiya, Höfling e Gonçalves (2008) verificaram a frequência e a expressão dos genes estruturais envolvidos na produção das mutacinas tipos I, II, III e IV, por meio da PCR e da RT-PCR¹¹. Avaliou-se 47 isolados clínicos de *S. mutans*, correspondentes a 47 diferentes genótipos identificados em estudos prévios (KAMIYA et al., 2005b; KLEIN et al., 2004) e obtidos de indivíduos adultos cárie-ativos e de pares mãe-filho livres de cárie. As análises, realizadas com *primers* específicos para a biossíntese de cada gene, revelaram a presença dos genes *mutAI*, *mutAII*, *mutAIII* e *mutAIV* em, respectivamente, 29,1%, <10%, 12,7% e 18,7% das amostras. Adicionalmente, com o uso da mutacinotipagem, observou-se alta diversidade fenotípica, onde aproximadamente 83% dos isolados analisados apresentaram diferentes perfis de atividade mutacinolítica contra ao menos uma das 30 cepas indicadoras testadas. A ausência de correlação entre o número de cepas inibidas e o número de genes expressos foi destacada pelos pesquisadores, uma vez que alguns genótipos amplificaram os quatro genes, mas não revelaram o mesmo espectro inibitório.

Rodrigues et al. (2008) avaliaram, pela PCR, a frequência dos genes envolvidos na biossíntese dos sorotipos *c*, *e*, *f* bem como dos genes envolvidos na

¹¹ Técnica amplamente utilizada para verificar a expressão gênica, uma vez que analisa o RNA responsável pela síntese de proteínas. A partir de um molde de cadeia simples de RNA, a enzima transcriptase reversa sintetiza uma cadeia de DNA complementar, a qual será amplificada pela PCR convencional. A detecção de uma proteína específica indica que DNA está sendo expresso e originando RNA mensageiro para sua síntese (UDVARDI; CZECHOWSKI; SCHEIBLE, 2008).

produção de mutacinas tipos I, II, III e IV em *S. mutans* isolados de 20 pré-escolares (4 a 5 anos de idade) com diferentes experiências de cárie dentária. A análise genético-molecular foi realizada com *primers* homólogos aos genes *SC*, *SE*, *SF* e *mutAI/III*, *mutAII* e *mutAIV*. De uma forma geral, o sorotipo *c* foi o mais predominante (80%) na amostra estudada, sendo que a infecção mista pelos sorotipos *c* e *f* foi evidenciada somente no grupo cárie-ativo. Todos os 200 isolados clínicos de *S. mutans* foram negativos para os genes das mutacinas I e III. Por outro lado, os genes *mutAII* e *mutAIV* foram detectados em 60% e 40% dos isolados do grupo cárie-ativo e em 80% e 70% dos isolados do grupo livre de cárie, respectivamente. Não foi identificada diferença significativa entre a experiência de cárie dentária da criança e o número de isolados positivos para os genes detectados. No entanto, observou-se correlação entre o sorotipo e a presença dos genes codificadores das mutacinas II e IV no grupo cárie-ativo. A partir desses resultados, os autores sugeriram que múltiplos sorotipos e a presença dos genes *mutAII* e *mutAIV* estariam relacionados com a cariogenicidade de *S. mutans*.

Utilizando metodologia similar, Valarini et al. (2009) reproduziram o trabalho supracitado visando verificar a presença dos genes *SC*, *SE*, *SF* e *mutAI/III*, *mutAII* e *mutAIV* em uma população adulta (18 a 34 anos de idade). Foram avaliados 280 isolados clínicos de *S. mutans* obtidos de 28 indivíduos com diferentes experiências de cárie dentária. Os resultados demonstraram que 84,2% da amostra pertencia ao sorotipo *c* e 15,8% possuía ambos os sorotipos *c* e *f*. A presença da mutacina III não foi detectada no grupo livre de cárie. Cerca de 32,1% e 21,4% dos isolados provenientes dos indivíduos cárie-ativos amplificaram, respectivamente, os genes *mutAIV* e *mutAI/III*. Além do mais, não foi observada associação entre a presença dos genes das mutacinas e a experiência de cárie dentária do participante.

Da mesma forma, em sua dissertação de mestrado, Ballini (2011) não encontrou correlação entre a presença do gene para a mutacina IV e a susceptibilidade à cárie dentária. Foram analisados 19 isolados clínicos de *S. mutans* obtidos de 24 crianças (7 a 10 anos de idade) com diferentes experiências de cárie. A presença do gene *mutAIV* foi detectada por PCR, a qual revelou amplificação dos fragmentos de DNA em 7 amostras (36,8%), sendo 4 isoladas dos 14 indivíduos sem cárie dentária e 3 provenientes dos 12 indivíduos cárie-ativos.

2.1.2.2 Produção de mutacinas X transmissibilidade de *S. mutans*

Grönroos et al. (1998) realizaram um estudo longitudinal na Finlândia com o objetivo de determinar a atividade mutacinolítica em isolados clínicos de *S. mutans* e examinar o possível papel das mutacinas na sua transmissão. Amostras bacterianas obtidas de 14 pares mãe-filho (18 a 36 meses de idade) foram avaliadas pelas técnicas de sorotipagem¹², ribotipagem¹³ e mutacinotipagem. Os isolados foram caracterizados em 52 ribotipos diferentes, sendo que aproximadamente 88% deles produziram mutacina contra mais de uma das 14 cepas indicadoras testadas. Uma provável transmissão materna foi sugerida em 64,2% das crianças uma vez que foram identificados ribotipos idênticos de *S. mutans* em nove pares mãe-filho. Os autores observaram que os ribotipos compartilhados por esses indivíduos apresentaram significativamente maior atividade mutacinolítica (mais cepas inibidas e maiores zonas de inibição) do que aqueles não transmitidas. A estabilidade da atividade mutacinolítica foi estudada, após cinco anos do exame inicial, em *S. mutans* obtidos de dez mães e de cinco crianças, em intervalos de um a sete anos. Durante o acompanhamento, os isolados de apenas uma criança apresentaram diferente padrão de atividade mutacinolítica. Dessa forma, concluiu-se que a produção de mutacinas é razoavelmente estável e pode ser considerada um fator de virulência de importância clínica na colonização inicial da cavidade bucal por *S. mutans*, facilitando a transmissão de bactérias das mães para seus respectivos filhos.

Em uma pesquisa publicada posteriormente foi sugerido que a produção de mutacinas não aumentaria a probabilidade de transmissão intrafamiliar de *S. mutans*. Van Loveren, Buijs e ten Cate (2000) analisaram a produção de mutacinas em *S. mutans* isolados dos membros de 12 famílias holandesas (mãe, pai e filho com 11 anos de idade), nas quais as crianças adquiriram os microrganismos após os 5 anos de idade. Todos os isolados bacterianos (aproximadamente 30 por participante)

¹² Caracterização de um microorganismo pela identificação de seus antígenos lipopolissacarídeos da parede celular (DARINI, 1994).

¹³ Método de tipagem molecular baseado na digestão do DNA cromossômico com uma dada enzima de restrição, seguida da hibridização com uma sonda específica para os genes que codificam o RNA ribossômico. Assim, evidenciam-se apenas os fragmentos que apresentam homologia com o DNA da sonda dentre os milhares de fragmentos gerados durante a clivagem (DARINI; MAGALHÃES; CROTT, 1998).

foram identificados fenotipicamente e testados pela técnica de mutacinotipagem contra 21 cepas indicadoras. O número de mutacinotipos por indivíduo variou de um a cinco, sendo detectados em média 1,6 nas crianças e 2,3 nos pais. Perfis semelhantes de atividade mutacinolítica foram encontrados em 7 dos 12 pares mãe-filho (58,3%), em 2 dos 8 pares pai-filho (25%) e entre os cônjuges de 4 famílias (50%). Entretanto, não houve correlação entre o número de cepas indicadoras inibidas ou tamanho das zonas de inibição e a presença de *S. mutans* com atividade de mutacina semelhante dentro das famílias.

Resultado similar, quanto à influência das mutacinas na transmissibilidade de *S. mutans*, foi observado por Li, S et al. (2005). Esses autores realizaram um estudo visando relacionar a detecção dos genes estruturais *mutA* em isolados clínicos de *S. mutans* com a transmissão materna dos microrganismos. Inicialmente, 200 isolados clínicos de *S. mutans* obtidos de 20 pares mãe-filho chineses foram genotipados por AP-PCR, a fim de determinar os genótipos transmitidos e não transmitidos verticalmente. Em seguida, os isolados maternos foram analisados, por PCR, quanto à presença dos genes codificadores dos tipos I, II e III de mutacinas, utilizando-se *primers* específicos para cada gene *mutA*. Um total de 45 diferentes genótipos de *S. mutans* foram identificados, sendo que a homologia genotípica foi constatada em 16 pares mãe-filho (80%), indicando transmissão materna de *S. mutans*. Dos 100 isolados maternos, 49 corresponderam aos 16 genótipos transmitidos e 51 aos outros 16 genótipos que não foram transmitidos às crianças. O gene *mutAI* foi detectado somente em 27 (53%) isolados não transmitidos, enquanto que os genes *mutAII* e *mutAIII* não foram amplificados pelas amostras estudadas. Esses resultados indicaram uma relação negativa entre a mutacina tipo I e a transmissão bacteriana, uma vez que os isolados de *S. mutans* portadores do gene *mutAI* não foram transmitidos pelas mães.

Mais recentemente, Zhan et al. (2012) investigaram em um estudo piloto a produção de mutacina como fator de virulência associado à transmissão materna de *S. mutans*. Os microrganismos foram isolados a partir da saliva coletada de 10 mães cárie-ativas e seus respectivos filhos (2 a 5 anos de idade). Por meio de mutacinotipagem e AP-PCR, avaliou-se a produção de mutacinas contra diversas cepas indicadoras e a transmissão dos isolados clínicos de *S. mutans*, respectivamente. A transferência de bactérias maternas foi verificada em quatro

pares mãe-filho (40%), onde observou-se o compartilhamento de sete genótipos idênticos de *S. mutans*. Os autores destacaram uma maior atividade mutacínolítica pelos genótipos transmitidos do que por aqueles não transmitidos.

2.2 TRANSMISSÃO E ESTABILIDADE DE COLONIZAÇÃO DE *S. mutans*

Na presente subsecção estão relacionadas, cronologicamente, pesquisas que passaram a empregar métodos de tipagem bacteriana (fenotípicos e/ou genotípicos) com maior poder discriminativo para demonstrar a similaridade entre cepas de *S. mutans*, em detrimento das limitações inerentes às técnicas anteriormente utilizadas, em especial à sorotipagem.

Berkowitz e Jordan (1975) foram um dos pesquisadores pioneiros a verificarem a probabilidade de transmissão materna de *S. mutans* por meio da mutacínopagem. Os autores analisaram os padrões de produção de mutacinas e sensibilidade às mesmas em 120 isolados de *S. mutans* obtidos de 4 pares mãe-filho americanos (4 bebês com faixa etária de 8 a 14 meses e suas respectivas mães). Os resultados permitiram a identificação de 42 mutacínótipos e mostraram que 119 isolados de *S. mutans* produziram mutacinas, as quais inibiram o crescimento de no mínimo uma das 18 cepas indicadoras testadas. Similaridade entre os mutacínótipos foi observada em todos os pares mãe-filho, permitindo a indicação das mães como a principal fonte de infecção por essa espécie bacteriana.

Estudos acerca da estabilidade de colonização por *S. mutans* iniciaram-se na Austrália com Rogers (1975), que avaliou a persistência de cepas bacterianas coletadas de seis indivíduos (12 a 19 anos de idade) em três momentos distintos, durante um período de seis meses. Após confirmação da identidade dos isolados de *S. mutans* por testes bioquímicos, os mesmos foram caracterizados por mutacínopagem. Cada participante apresentou um único mutacínótipo de *S. mutans*, o qual foi detectado novamente em todas as amostragens. Dessa forma, o autor sugeriu um predomínio específico e a estabilidade da população de *S. mutans* na cavidade bucal dos indivíduos.

Ao longo dos anos, uma sucessão de pesquisas investigou as fontes de infecção na transmissão intrafamiliar de *S. mutans*, avaliando-se populações de

diferentes origens demográficas. Rogers (1981) caracterizou, por mutacinotipagem, isolados de *S. mutans* obtidos de 143 membros de 32 famílias australianas. De uma forma geral, em 28 famílias (87,5%) um mutacinotipo semelhante foi compartilhado por dois ou mais membros, sendo um deles sempre algum dos pais. Apenas um mutacinotipo foi encontrado em 15 famílias (46,8%). Em dez dessas, todos os membros abrigaram a mesma cepa. Transferências materna e paterna foram indicadas, respectivamente, em quatro (12,5%) e em três (9,4%) famílias com mais de um mutacinotipo. Assim sendo, o autor concluiu ser possível a transmissão intrafamiliar de algumas cepas de *S. mutans*, mas que a fonte de infecção pode variar entre as famílias.

Visando obter informações mais detalhadas sobre o estabelecimento precoce de *S. mutans* na cavidade bucal infantil, Davey e Rogers (1984) estudaram isolados bacterianos dos membros (mãe, pai e filhos) de dez famílias australianas, das quais cinco foram reavaliadas após seis meses. Cada amostra foi identificada bioquimicamente e fenotipicamente, por mutacinotipagem, analisando-se a presença de perfis similares de produção de mutacina contra 12 cepas indicadoras e de sensibilidade às bacteriocinas produzidas por dez cepas de referência. Os resultados mostraram que 78% dos adultos e 45% das crianças infectadas possuíam de dois a quatro mutacinotipos de *S. mutans* diferentes. Durante as duas amostragens, foi observada semelhança no padrão de mutacinas entre ao menos um isolado bacteriano dos pares mãe-filho de todas as famílias, confirmando, mais uma vez, a mãe como principal fonte de infecção por *S. mutans*. Houve compartilhamento de mutacinotipos idênticos de *S. mutans* entre os cônjuges de três famílias (30%) e entre pai e filho de somente uma delas (10%). Os autores sugeriram que o nível salivar materno de *S. mutans* ($>10^5$ UFC/ml) pode estar correlacionado com a probabilidade da criança ser infectada e que, apesar do curto período de acompanhamento, a detecção de mutacinotipos similares, seis meses após a coleta inicial, seria um indicativo da persistência de *S. mutans* na cavidade bucal dos indivíduos.

Ainda por mutacinotipagem, Berkowitz e Jones (1985) investigaram a transmissão vertical de *S. mutans* entre 20 pares mãe-filho americanos. Para esse fim, foi avaliada a produção de mutacinas por 314 isolados de *S. mutans*, obtidos de 20 crianças (10 a 16 meses de idade) e suas respectivas mães. Todas as amostras

exibiram zona de inibição contra no mínimo uma das 15 cepas indicadoras testadas e a comparação entre os padrões inibitórios permitiu a diferenciação dos isolados em 41 mutacinotipos diferentes. Grande parte das mães (70%) abrigou múltiplos tipos de mutacina (dois ou três), enquanto que na maioria das crianças (65%) foi detectado um único mutacinotipo. Como resultado principal, observou-se que todos os pares mãe-filho compartilharam no mínimo uma cepa de *S. mutans* com perfil de produção de mutacina semelhante, embora nem todos os mutacinotipos maternos tenham sido transferidos à criança.

Caufield e Walker (1989) foram um dos primeiros pesquisadores a utilizarem um método genotípico, polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP)¹⁴, para estudar a transmissão e a estabilidade de colonização de *S. mutans* no âmbito familiar. Os microrganismos foram obtidos de três pares mãe-filho americanos (dez isolados clínicos por participante), coletados no período em que *S. mutans* foram detectados pela primeira vez no biofilme dentário da criança (idade média=14,7 meses). Após três anos, realizou-se uma nova coleta em ambos os membros de somente um par mãe-filho. Utilizando-se as endonucleases de restrição *HindIII* e *HaeIII*, os autores demonstraram que no momento inicial todas as crianças adquiriram de um a dois genótipos de *S. mutans* idênticos a algum dos encontrados na sua genitora, sustentando a hipótese de que essas bactérias são transmitidas verticalmente da mãe para o filho. Além disso, genótipos de *S. mutans* mantiveram-se estáveis, ao longo do estudo, na cavidade bucal do par mãe-filho avaliado. O genótipo materno adquirido pela criança e dois dos três genótipos colonizadores da mãe foram conservados após o intervalo de três anos.

Concomitantemente, Kulkarni, Chan e Sandham (1989) demonstraram por técnica similar, a análise por enzima de restrição (REA)¹⁵, uma mesma tendência à homologia de determinados genótipos de *S. mutans* entre os membros familiares, bem como a possibilidade de ocorrência de genótipos extrafamiliares em alguns indivíduos. A população do estudo consistiu de 19 membros (mãe, pai e filhos) de 5 famílias canadenses com diferentes origens culturais e geográficas. Em uma única

¹⁴ Técnica que compara o padrão polimórfico encontrado no comprimento de fragmentos de DNA de diferentes amostras. Os fragmentos são obtidos por cortes na fita dupla de DNA, com o uso de enzimas de restrição, e observados por hibridização com sequências homólogas de DNA, marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência (ESTRELA, 2005).

¹⁵ Técnica de genotipagem que envolve a análise comparativa dos padrões de bandas do DNA celular clivado por enzimas de restrição e submetido à eletroforese (ALALUUSUA, 1991).

família foi realizada uma amostragem extra nos indivíduos adultos, 6 meses após a inicial. O DNA bacteriano, de um total de 322 isolados de *S. mutans*, foi digerido com as endonucleases *EcoRI* e/ou *HindIII* e os perfis genotípicos resultantes foram comparados para avaliar a transmissão dos microrganismos. Os indivíduos adultos (idade média=39,3 anos) e seus filhos (idade média=12,4 anos) abrigaram em média 1,6 e 2,8 genótipos, respectivamente. Transmissão intrafamiliar foi evidenciada pela detecção de genótipos similares entre todos os membros de três famílias (60%), inclusive entre os cônjuges. Nessas famílias, os genótipos compartilhados, representando o mesmo padrão de restrição, eram numericamente dominantes nos indivíduos. Em relação ao casal acompanhado longitudinalmente, o único genótipo exclusivo de cada um dos indivíduos adultos foi estável ao longo do tempo.

Kozai et al. (1991) estudaram o efeito da quimioterapia sobre a estabilidade da infecção por *S. mutans*. Os isolados bacterianos foram obtidos a partir de dez indivíduos adultos antes e após o tratamento com verniz de clorexidina, o qual propiciou a não detecção de *S. mutans* na cavidade bucal dos participantes por um período médio de 14,6 semanas. A análise dos isolados pela REA revelou que todos os indivíduos foram recolonizados por uma cepa primária de *S. mutans* idêntica a alguma detectada antes do tratamento quimioterápico. Por outro lado, cepas secundárias foram altamente susceptíveis a serem perdidas ou adquiridas. Os autores ressaltaram que a capacidade de determinadas cepas de *S. mutans* persistirem após um período como indetectáveis não parece estar relacionada com sua resistência à clorexidina ou com seu mecanismo de aderência sacarose dependente.

A possibilidade de transmissão horizontal entre indivíduos na idade adulta e com a microbiota bucal já estabelecida foi constatada por Saarela et al. (1993). Esses autores conduziram um estudo na Finlândia para avaliar a transmissão de *S. mutans* entre os cônjuges de três casais. Amostras bacterianas, obtidas de todos os indivíduos, foram identificadas com base na morfologia das colônias, testes bioquímicos e sorotipagem. A similaridade entre as cepas foi determinada por ribotipagem, onde o DNA cromossômico de um total de 39 isolados de *S. mutans* foi digerido com as endonucleases de restrição *HindIII* e *SmaI*. Os participantes abrigaram de um a três ribotipos diferentes de *S. mutans* e os cônjuges de dois casais (66,6%) compartilharam um ribotipo idêntico.

Alaluusua et al. (1994) demonstraram a estabilidade da colonização por *S. mutans* em crianças, por um período de até sete anos. Os microrganismos foram obtidos a partir de sete crianças finlandesas aos 5 e, posteriormente, aos 10 e/ou 12 anos de idade. Um total de 40 isolados clínicos foram caracterizados por ribotipagem, utilizando-se diferentes endonucleases de restrição para digerir o DNA cromossômico bacteriano. Com a enzima *HindIII* foi detectado um único ribotipo em cada criança, enquanto que com a enzima *EcoRI* foram detectados diferentes ribotipos em quatro participantes. Durante o acompanhamento, em seis das sete crianças (85,7%) foi encontrado ao menos um ribotipo de *S. mutans* idêntico ao presente na coleta inicial. De uma forma geral, esses resultados sugerem que aos cinco anos de idade a infecção por *S. mutans* já está estabilizada e as cepas colonizadoras são conservadas como parte da microbiota bucal por diversos anos.

No Brasil, Azevedo e Zelante (1994) avaliaram uma possível similaridade intrafamiliar no padrão de atividade mutacinolítica de *S. mutans* isolados dos 112 membros de 22 famílias, formadas pelos pais e no mínimo dois filhos (um deles ainda edêntulo). De um total de 397 cepas de estreptococos do grupo *mutans* (EGM), 193 foram identificadas como *S. mutans* e mutacinotipadas. Destas, apenas 55 (28,5%) produziram mutacina contra no mínimo uma das 15 cepas indicadoras testadas, totalizando 39 mutacinotipos diferentes de *S. mutans*. Nas famílias estudadas foram detectados mutacinotipos semelhantes compartilhados por todos os membros familiares (30%) e em 13 pares mãe-filho (59%), 6 pares pai-filho (40%), 11 pares de irmãos (50%) e 5 casais (33%). Apesar de ter sido constatada a ocorrência de transmissão intrafamiliar de *S. mutans*, as mães não puderam ser consideradas sua fonte exclusiva, desde que padrões similares foram identificados na cavidade bucal de outros membros numa mesma família.

O termo “fidelidade de transmissão” foi utilizado pela primeira vez por Li e Caufield (1995) para definir o grau de semelhança entre genótipos de *S. mutans* isolados de pares mãe-filho. Os autores realizaram um acompanhamento longitudinal de 34 pares mãe-filho americanos, com o objetivo de analisar a transmissão materna no momento da aquisição inicial de *S. mutans* pelo bebê. Os participantes foram examinados em intervalos de três meses, desde o nascimento até os 3 anos de idade da criança. As mães selecionadas eram primíparas, com idade média de 24 anos, abrigavam níveis relativamente elevados de *S. mutans* na

saliva ($2,5 \times 10^4$ UFC/ml) e possuíam CPO-D médio igual a 35. Adicionalmente, amostras bacterianas também foram obtidas de sete pais que partilhavam das mesmas famílias analisadas. Os isolados de *S. mutans* (aproximadamente nove por indivíduo) foram identificados por meio de características bioquímicas. Em seguida, a genotipagem foi realizada pela REA, utilizando-se a endonuclease *HaeIII* para determinar as similaridades dentro de cada família. A média do número de genótipos distintos de *S. mutans* abrigados pelos participantes foi estatisticamente superior nas mães (1,7) do que nos filhos (1,2). Os resultados desse estudo também apontaram as mães como a principal fonte de transmissão de *S. mutans* para seus bebês. Em 24 pares mãe-filho (70,6%), durante a aquisição inicial, observou-se genótipos de *S. mutans* homólogos entre as crianças e suas respectivas genitoras. Nas famílias com isolados bacterianos paternos disponíveis, não houve homologia de genótipos de *S. mutans* entre os pares pai-filho, bem como entre os cônjuges dos sete casais. Curiosamente, a fidelidade de transmissão de *S. mutans* das mães para seus filhos pareceu ser gênero e raça-específica. Os genótipos detectados nas crianças do gênero feminino e nas negras apresentaram homologia de 88,2% e 87,5% com os genótipos maternos, respectivamente. Além disso, as crianças do gênero masculino colonizadas pelos mesmos genótipos de suas mães apresentaram probabilidade 13 vezes maior de desenvolver cárie dentária do que as do gênero feminino. Os autores sugeriram a transferência materna não somente de imunoglobulinas via placenta e colostro, mas também de um conjunto de bactérias indígenas, incluindo *S. mutans*, capazes de coexistirem com esses fatores imunológicos derivados direta ou indiretamente da mãe. Entretanto, os mesmos ressaltaram que outras pesquisas precisariam ser realizadas para analisar um possível papel do sistema imune da criança na seleção das cepas bacterianas que serão eliminadas de sua cavidade bucal.

Alaluusua et al. (1996) pesquisaram, por ribotipagem, a diversidade genotípica de *S. mutans* e o papel da mãe na transmissão de genótipos para crianças com Cárie Precoce da Infância (CPI). Participaram do estudo, com suas respectivas mães, 12 crianças finlandesas de 18 a 36 meses de idade, sendo 6 livres de cárie e 6 com CPI (ceo-s=17 a 63). Quatro mães de crianças livres de cárie foram instruídas a escovarem seus dentes periodicamente com um gel contendo digluconato de clorexidina 0,3% e fluoreto de sódio 0,2%, a fim de investigar

possível efeito na prevenção da colonização da criança por *S. mutans*. Um total de 137 isolados bacterianos, previamente sorotipados, foram ribotipados por meio da digestão do DNA cromossômico pela endonuclease de restrição *HindIII*. As crianças com CPI, expostas ao consumo frequente de sacarose, apresentaram altos níveis de *S. mutans* no biofilme dentário e quatro delas (66,6%) foram colonizadas por mais de um ribotipo. As crianças livres de cárie apresentaram baixos níveis de *S. mutans* e somente uma delas (16,6%) abrigou mais de um ribotipo. No entanto, as mães das crianças com CPI tiveram níveis salivares e número de ribotipos de *S. mutans* semelhantes às mães das crianças livres de cárie. Dessa forma, os autores constataram que o uso do gel de clorexidina pelas mães não afetou significativamente a colonização por *S. mutans* em seus filhos. Em ambos os grupos, as mães foram a principal fonte de infecção, desde que nove (36%) dos 25 ribotipos maternos foram detectados nas crianças. Em geral, um a dois ribotipos semelhantes foram encontrados em oito pares mãe-filho (66,66%), sendo quatro formados por crianças com CPI. Duas crianças livres de cárie foram examinadas aos 1,5 e aos 3 anos de idade e indicaram a ocorrência de uma colonização transitória por *S. mutans*. Uma delas abrigou dois ribotipos na primeira amostragem e nenhum no acompanhamento; a outra abrigou somente um ribotipo de *S. mutans* no exame inicial e outro, diferente do original, na segunda amostragem.

A similaridade intrafamiliar de genótipos de *S. mutans* também foi avaliada por Redmo Emanuelsson, Li e Bratthall (1998). Amostras bacterianas foram obtidas de todos os membros de 11 famílias suecas (11 filhos primogênitos com idade média de 36 meses e seus respectivos pais) com níveis detectáveis de *S. mutans*. Os isolados foram sorotipados e, posteriormente, genotipados pela REA, utilizando-se a endonuclease de restrição *HaeIII*. Os adultos foram colonizados por um a três distintos genótipos de *S. mutans*, enquanto que nove crianças (81,8%) abrigaram apenas um genótipo. Segundo os autores, os resultados dessa pesquisa sugerem que as crianças adquiriram *S. mutans* tanto de fonte materna quanto extrafamiliar, uma vez que seis crianças compartilharam um genótipo de *S. mutans* com suas mães (54,5%) e as outras cinco foram colonizadas por genótipos diferentes aos encontrados em seus pais. Nenhuma correspondência de genótipos foi observada entre os pares pai-filho e entre os cônjuges das famílias analisadas. Nesse estudo destacou-se a observação de uma maior frequência de genótipos

idênticos nos pares mãe-filho em que as genitoras eram suas cuidadoras primárias e possuíam altos níveis salivares de *S. mutans*.

No mesmo ano e utilizando metodologia similar, Redmo Emanuelsson e Wang (1998) relataram resultados diferentes do trabalho anterior ao analisarem a distribuição intrafamiliar de genótipos de *S. mutans* em 11 famílias chinesas. Isolados bacterianos (em média 8,4 por participante) obtidos de todos os membros familiares (11 crianças com idade média de 38 meses e seus respectivos pais) foram identificados e genotipados conforme Redmo Emanuelsson, Li e Bratthall (1998). Foram detectados um ou dois genótipos de *S. mutans* em cada indivíduo, sendo que os adultos abrigaram, em média, praticamente o mesmo número de genótipos (1,2) que as crianças (1,4). Transmissão intrafamiliar ocorreu em 7 das 11 famílias analisadas (63,63%): 4 pares mãe-filho (36,3%) e 3 pares pai-filho (27,2%) compartilharam genótipos idênticos de *S. mutans*. Além disso, observou-se homologia de um genótipo entre todos os membros de duas famílias (18,2%) e somente entre os cônjuges em um casal (9,1). Os autores revelaram uma tendência para a transmissão gênero-específica ao detectarem que todas as sete crianças do gênero feminino (100%), em contraste com apenas duas das quatro crianças do gênero masculino (50%), apresentavam um genótipo semelhante a um ou a ambos os pais.

No Japão, Kozai et al. (1999) conduziram um extensivo estudo para investigar a distribuição intrafamiliar de *S. mutans* entre os membros de 20 famílias (20 mães, 20 pais e 36 filhos). Um total de 114 genótipos de *S. mutans* foram detectados dentre os 1908 isolados bacterianos previamente identificados por provas bioquímicas e genotipados pela REA, com o uso das enzimas *EcoRI*, *HindIII* e *HaeIII*. Cada participante abrigou de um a quatro genótipos diferentes de *S. mutans* (média de 1,5) e tanto as mães quanto os pais foram indicados como prováveis fontes de infecção. Genótipos homólogos foram encontrados em 18 pares mãe-filho (90%), 11 pares pai-filho (55%) e entre os cônjuges de 2 casais (10%). Dos 52 genótipos de *S. mutans* detectados nas crianças, 28 (53,8%) corresponderam aos maternos e 11 (21,1%) aos paternos.

O efeito da amamentação sobre a fidelidade de transmissão de *S. mutans* foi investigado por Li, Wang e Caufield (2000). Amostras bacterianas foram coletadas de todos os membros de 48 famílias chinesas em duas ocasiões, com intervalo de 6 meses. As crianças participantes possuíam de 2 a 3 anos de idade e foram

amamentadas por aleitamento materno ou artificial. Um total de 710 isolados foi identificado bioquimicamente em 46 mães, 36 pais e 38 filhos, *S. mutans* positivos nas duas amostragens. A genotipagem por REA, com auxílio da endonuclease de restrição *HaeIII*, e pela AP-PCR revelou em média 1,8 e 1,5 genótipos diferentes de *S. mutans* nos adultos e nas crianças, respectivamente. Dezesete filhos (44,7%) exibiram genótipos idênticos aos detectados nas suas mães, sendo que 88,2% dessas crianças foram amamentadas por aleitamento materno. Adicionalmente, observou-se uma correlação significativa entre a fidelidade de transmissão de *S. mutans* e o tempo de duração do aleitamento materno. Mães que amamentaram por um período superior a nove meses foram mais propensas a compartilhar *S. mutans* com seus filhos. Entretanto, fatores como gênero, tipo sanguíneo, prevalência de cárie dentária e atuação como cuidador primário não apresentaram influências significativas sobre a fidelidade de transmissão. Embora não tenha sido detectado nenhum genótipo paterno em seus respectivos filhos, os autores reforçaram que a criança também pode ter adquirido *S. mutans* de fonte não materna.

Redmo Emanuelsson e Thornqvist (2000) reavaliaram, após um período de dois ou cinco anos, o mesmo grupo de 11 famílias suecas examinadas por Redmo Emanuelsson, Li e Bratthall (1998). O objetivo do trabalho foi verificar a persistência e transmissão de genótipos de *S. mutans* em 11 mães, 10 pais e 11 filhos, estes com idade média de 7,2 anos no exame de acompanhamento. Um total de 634 isolados bacterianos foram coletados de todos os membros familiares e genotipados por REA, utilizando-se a endonuclease de restrição *HaeIII*. O número de diferentes genótipos de *S. mutans* colonizadores de um indivíduo foi maior entre os adultos (um a quatro) do que entre as crianças (um ou dois). A comparação dos padrões de DNA encontrados no exame inicial e no acompanhamento revelou que todos os adultos e nove crianças (81,8%) abrigavam um ou dois genótipos de *S. mutans* constantes em ambas as amostragens. Enquanto que, em nove adultos e em duas crianças genótipos que foram inicialmente encontrados não foram detectados no acompanhamento, em oito adultos e em duas crianças foram adquiridos até dois novos genótipos. Observou-se ainda que seis pares mãe-filho (54,5%) compartilharam um genótipo de *S. mutans* semelhante na amostragem inicial e esse padrão permaneceu em cinco pares no final do estudo. Similaridade entre genótipos foi constatada em somente um par pai-filho (10%) e 5 das 11

crianças (45,4%) demonstraram evidência de transmissão extrafamiliar. Segundo os autores, os resultados sugerem que genótipos de *S. mutans* apresentam grau bastante elevado de consistência em adultos e em crianças entre 3 e 8 anos de idade, indicando tanto a persistência quanto o ganho e/ou a perda de cepas bacterianas pelos hospedeiros ao longo dos anos.

O primeiro relato da presença de genótipos idênticos de *S. mutans* entre crianças de famílias independentes foi publicado por Mattos-Graner et al. (2001a). Os pesquisadores avaliaram uma coorte de 35 crianças brasileiras (idade média=23 meses) infectadas por *S. mutans* e usuárias de diferentes creches durante dez horas por dia, cinco dias por semana. Um total de 74 isolados de *S. mutans* foram identificados bioquimicamente, quanto à espécie, e apenas as 24 crianças com dois ou mais isolados foram incluídas nas análises comparativas da diversidade genotípica. A genotipagem pela AP-PCR e por RFLP, com a endonuclease de restrição *HaeIII*, detectou 32 genótipos diferentes de *S. mutans* nas crianças, sendo que somente 7 (29,1%) abrigaram mais de um genótipo. A transmissão horizontal de *S. mutans* foi sugerida diante da constatação de similaridade genética entre um genótipo compartilhado por duas crianças não relacionadas geneticamente, mas atendidas pela mesma creche.

Em um estudo longitudinal, Nie, Fan e Bian (2002) avaliaram a possibilidade de transmissão horizontal de *S. mutans* entre cônjuges chineses que conviviam no mínimo a dois anos na mesma residência. Foram coletadas amostras de biofilme das superfícies dentárias de 22 indivíduos adultos (11 casais) em um exame inicial e após 3 meses. Um total de 273 isolados de *S. mutans* foram identificados, por testes bioquímicos, em 20 participantes (90,9%). O casal não colonizado por esses microrganismos foi excluído da pesquisa. A análise do DNA, realizada por RFLP e com utilização da endonuclease de restrição *HaeIII*, evidenciou 18 genótipos diferentes de *S. mutans* na população estudada. A grande maioria dos participantes (85%) abrigou somente um genótipo e três (15%) indivíduos abrigaram dois. Não houve correspondência entre os genótipos de *S. mutans* em oito casais (80%); entretanto, os cônjuges de um casal compartilharam um mesmo genótipo no primeiro exame, o qual não foi detectado no marido durante o acompanhamento. Em contrapartida, os cônjuges de outro casal apresentaram um genótipo idêntico no exame subsequente, mas não na coleta inicial. Segundo os autores, esses dados

sugerem que a transmissão bacteriana pode ocorrer em idade adulta entre cônjuges, mas que parece difícil sua colonização permanente em outra cavidade bucal.

A transmissão horizontal de *S. mutans* entre crianças de um berçário infantil também foi identificada em uma população japonesa por Tedjosasongko e Kozai (2002). Participaram de um estudo longitudinal 6 cuidadoras, 14 casais e 39 crianças (2 a 25 meses de idade) frequentadoras do berçário por cerca de 10 horas por dia, 5 dias por semana. Amostras bacterianas foram coletas dos adultos em um único momento e das crianças, mensalmente, por até 30 meses. A verificação taxonômica dos isolados de *S. mutans* foi realizada por meio de provas bioquímicas e, em seguida, o DNA dos mesmos foi digerido com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *HaeIII* para determinar a fonte de infecção. Um total de 21 crianças (53,8%) foram contaminadas durante o acompanhamento, sendo que no final do experimento 17 delas (81%) abrigaram somente um genótipo de *S. mutans*. Não houve evidência de homologia entre as cepas de *S. mutans* das crianças e das cuidadoras do berçário; entretanto, seis alunos (28,5%) compartilharam um genótipo similar de *S. mutans*. A transmissão intrafamiliar foi observada em seis pares mãe-filho (33,3%) e dois pares pai-filho (8,3%). Após a infecção inicial, duas crianças adquiriram *S. mutans* adicionais de fontes intra e extrafamiliar. Esse estudo sugeriu que, além das condições de saúde bucal, o meio ambiente também desempenha importante papel na aquisição e transmissão de *S. mutans* em crianças.

Köhler et al. (2003) monitoraram 16 famílias suecas por 16 anos e demonstraram tanto a possibilidade de rotas de transmissão intrafamiliar quanto a estabilidade da colonização por *S. mutans*. Foram examinadas 16 mães com elevados níveis de *S. mutans* na saliva ($\geq 10^6$ UFC/ml) e seus respectivos filhos, em intervalos de 4 meses, dos 15 meses até os 3 anos de idade. Treze dessas crianças foram reavaliadas em consultas aos 4, 7, 11, 15 e 19 anos de idade. Também foram incluídos no estudo um número limitado de pais (sete) e alguns irmãos (quatro). A ribotipagem de 192 isolados clínicos de *S. mutans* foi realizada com o uso da endonuclease de restrição *HindIII*. De um a cinco ribotipos foram detectados por participante, sendo que os genótipos estabelecidos precocemente foram ocasionalmente perdidos e novos genótipos foram adquiridos ao longo dos anos. Dez das 13 crianças (77%) examinadas longitudinalmente apresentaram persistência na colonização de no mínimo um ribotipo de *S. mutans* até a idade

adulta. A avaliação de homologia entre os ribotipos revelou transmissão vertical de cepas de *S. mutans* em 14 dos 16 pares mãe-filho (88%) e em 6 dos 7 pares de pai-filho (85,7%). Evidência de transmissão horizontal entre todos os membros (cônjuges e irmãos) foi constatada em duas famílias analisadas.

Utilizando diferentes métodos moleculares, Redmo Emanuelsson et al. (2003) também demonstraram a estabilidade da colonização de *S. mutans* em adultos. Em duas ocasiões, com intervalo de 4 a 7 meses, foram obtidas amostras de placa bacteriana de diferentes sítios da cavidade bucal de 13 indivíduos suecos (idade média=25,2 anos). Um total de 546 isolados de *S. mutans* foram identificados por PCR e genotipados pela AP-PCR. Essa técnica apontou até sete genótipos diferentes em um único participante. Os resultados também revelaram que distintos genótipos de *S. mutans* podem colonizar um único sítio da cavidade bucal, e que vários sítios podem ser colonizados por um mesmo genótipo. Até três genótipos idênticos foram detectados após um período de quatro a sete meses em 12 indivíduos (92%), indicando a persistência de genótipos de *S. mutans*, em um mesmo sítio, por vários meses.

Spolidorio et al. (2003) estudaram o grau de similaridade intrafamiliar entre *S. mutans* isolados dos 88 membros de 22 famílias brasileiras, constituídas por mãe, pai, um filho primogênito e um bebê com idade entre 5 e 18 meses. Após coleta e isolamento dos microrganismos, realizou-se a identificação bioquímica das cepas bacterianas. A genotipagem dos 374 isolados identificados como *S. mutans* foi estabelecida pela AP-PCR, e tanto as mães quanto os pais apresentaram, respectivamente, genótipos similares aos dos bebês em 12 (54,5%) e em 3 (13,7%) famílias analisadas. A ocorrência de transmissão horizontal foi sugerida entre 7 bebês (31,8%) que compartilharam genótipos idênticos de *S. mutans* com seu irmão mais velho. Os autores concluíram que a distribuição de *S. mutans* difere entre as famílias e que, apesar da genitora ser o principal reservatório dos microrganismos transmitidos aos seus filhos, outras fontes intrafamiliares devem ser consideradas.

A ocorrência de diferentes vias de transmissão intrafamiliar de *S. mutans* também foi divulgada por Ersin et al. (2004). Participou do estudo um grupo de famílias turcas formado por 3 pais, 8 mães ($\geq 10^6$ UFC de *S. mutans*/ml) e seus respectivos filhos (2 a 3 anos de idade). Aproximadamente três isolados de *S. mutans*, por participante, foram identificados por testes bioquímicos e genotipados

pela AP-PCR. A transmissão de genótipos de *S. mutans* foi evidenciada em todos os oito pares mãe-filho e nos três pares pai-filho, implicando tanto as mães quanto os pais como possíveis fontes de infecção para as crianças. Adicionalmente, observou-se compartilhamento de genótipos semelhantes entre os cônjuges dos três casais, sugerindo uma possível transmissão horizontal entre os adultos.

Uma tendência para a persistência de genótipos de *S. mutans* transmitidos pelas mães é relatada por Klein et al. (2004), os quais realizaram um estudo longitudinal para avaliar transmissão, estabilidade e diversidade genotípica em 16 pares mãe-filho brasileiros. As crianças (idade média de 5,9 meses) foram acompanhadas por um período médio de 19,2 meses, sendo que, bimestralmente, foram coletadas amostras de microrganismos a partir de quatro sítios diferentes de sua cavidade bucal. Os isolados bacterianos das mães foram coletados em uma única ocasião, no momento em que *S. mutans* foi detectado em seus filhos pela primeira vez (idade média=15,4 meses). Um total de 195 e 773 isolados bacterianos provenientes, respectivamente, das mães e das crianças foram identificados como *S. mutans* por PCR e genotipados pela AP-PCR. Os resultados revelaram 52 genótipos diferentes detectados nas crianças, mas somente 16 deles (30,7%) foram transmitidos por suas respectivas mães. A transmissão vertical de 1 a 3 genótipos de *S. mutans* ocorreu em 13 dos 16 pares avaliados (81,25%). Nenhuma das crianças que frequentavam o mesmo ambiente escolar apresentou genótipos de *S. mutans* idênticos, descartando a ocorrência de transmissão horizontal entre as mesmas. Em metade delas, dos 30 genótipos distintos detectados no momento da aquisição inicial, 19 (63,3%) foram transitórios e 11 (36,7%) mantiveram-se estáveis no acompanhamento. Oito destes genótipos foram transmitidos pelas mães e permaneceram colonizando a cavidade bucal das crianças por um período maior (7,18 meses em média) do que aqueles não transmitidos (2,87 meses em média). De uma forma geral, observou-se um aumento no número de genótipos de *S. mutans* que colonizavam a cavidade bucal das crianças, sendo que alguns permaneceram estáveis e outros, idênticos ou não aos das mães, foram adquiridos ou perdidos.

Um dos objetivos do estudo longitudinal realizado por Lindquist e Emilson (2004) na Suécia foi avaliar a aquisição e a persistência de genótipos de *S. mutans* em 12 mães e 15 filhos, no decorrer dos primeiros anos de vida da criança.

Inicialmente, os isolados clínicos foram obtidos de ambos os membros familiares quando o filho apresentava seis meses de idade. Em seguida, foram realizadas sucessivas coletas a cada 6 meses até os três anos de idade da criança e anualmente até os sete anos. Durante esse acompanhamento, somente 10 das 15 crianças (66,6%) avaliadas adquiriram *S. mutans* entre 1,5 e 5 anos de idade. A tipagem dos isolados foi realizada por RFLP, utilizando-se a endonuclease de restrição *HindIII*, e revelou de dois a cinco diferentes genótipos de *S. mutans* nas mães e de um a três nas crianças. Dos dez pares mãe-filho com cultura positiva para *S. mutans*, sete (70%) compartilharam um ou mais genótipos homólogos, indicando a ocorrência de transmissão materna. Somente 8 (40%) dos 20 genótipos de *S. mutans* detectados nas crianças eram idênticos aos de suas mães. Além do mais, duas crianças da mesma família exibiram um mesmo genótipo que não foi detectado na cavidade bucal da respectiva mãe. Persistência, aquisição e perda de genótipos de *S. mutans* foram observados tanto nas mães quanto nas crianças ao longo dos sete anos.

Com o objetivo de elucidar se as alterações ambientais provocadas pelo uso de aparelhos ortodônticos fixos poderiam causar o aparecimento de novos genótipos bacterianos e/ou a perda daqueles preexistentes, Liu et al. (2004) estudaram a estabilidade genotípica de *S. mutans* durante a terapia ortodôntica. Amostras de placa bacteriana foram obtidas de 17 pacientes chineses (idade média=12 anos e 6 meses) antes e após 1, 3 e 6 meses do início do tratamento. Os isolados bacterianos foram identificados com base nas suas propriedades bioquímicas e morfológicas e, geneticamente, pela PCR com *primers* específicos. A utilização posterior da AP-PCR detectou 25 genótipos diferentes (máximo de três em um participante) dentre os 673 isolados clínicos de *S. mutans*. Em 100% dos pacientes, todos os genótipos inicialmente detectados foram novamente encontrados durante o acompanhamento longitudinal. Um novo genótipo de *S. mutans* foi encontrado após um mês de tratamento em somente um paciente. Os autores ressaltaram que os genótipos de *S. mutans* foram bastante estáveis na cavidade bucal dos participantes, mas que seria muito difícil concluir que o genótipo adicional se estabeleceu devido à instalação do aparelho fixo.

Em uma pesquisa inovadora, Figueiredo, Cruz e Caufield (2005) estudaram a transmissibilidade de *S. mutans* entre 18 mães brasileiras e seus filhos

adotivos (N=31). As mães selecionadas, com idade entre 20 e 60 anos, adotaram seus respectivos filhos antes deles completarem 6 meses de idade. Amostras de *S. mutans* foram isoladas de todos os participantes e genotipadas pela AP-PCR. Os resultados mostraram a presença de genótipos homólogos em apenas 6 (19,3%) dos 31 pares mãe-filho adotivo. A constatação de um predomínio de genótipos diferentes de *S. mutans* nas crianças adotadas, associado à baixa prevalência de cárie dentária nas mesmas, induziu os autores a sugerirem, como medida profilática, a introdução de cepas não maternas e/ou menos virulentas na cavidade bucal dos bebês, antes da erupção dos primeiros dentes decíduos.

Nos Estados Unidos, Li,Y et al. (2005) realizaram um estudo de coorte prospectivo que avaliou, de forma abrangente, a influência de diversas variáveis maternas e eventos perinatais sobre a aquisição inicial de *S. mutans* por bebês. Foram acompanhados, periodicamente, 156 pares mãe-filho ao longo de quatro anos, desde o terceiro trimestre da gestação. Isolados clínicos foram coletados em cada visita semestral, sendo que a análise fenotípica das colônias bacterianas detectou *S. mutans* em apenas 55 crianças (35,3%), com idade média de contaminação aos 22,3 meses. Por meio de análises uni e multivariadas, constatou-se que os fatores maternos: tipo de parto, idade, período gestacional, índice de cárie dentária, nível salivar de *S. mutans*, experiência prévia de infecção por doença sexualmente transmissível e renda anual familiar tiveram efeitos significativos na contaminação precoce dos bebês por *S. mutans*. O tipo de parto influenciou significativamente a idade da aquisição inicial; os bebês nascidos por parto cesariana (G1) adquiriram os patógenos mais precocemente (17,1 meses) do que os nascidos por parto natural (G2) (28,8 meses). No mesmo trabalho, 37 pares mãe-filho participaram de um subestudo de tipagem genotípica dos isolados, pela AP-PCR, permitindo a análise da fidelidade de transmissão de *S. mutans*. Os resultados apontaram uma taxa de transmissão vertical de 88,9%, sendo que a homologia de genótipos nos bebês do G1 foi estatisticamente superior em relação aos bebês do G2. As 6 crianças do G1 abrigaram um único genótipo de *S. mutans*, que era idêntico ao de suas respectivas mães (100% de fidelidade); enquanto que as 31 crianças do G2 abrigaram até 3 genótipos diferentes e compartilharam 83,3% deles com suas respectivas mães.

Liu et al. (2007) sugeriram a transmissão horizontal de genótipos de *S. mutans* entre crianças chinesas, não relacionadas geneticamente, e com convívio extrafamiliar por longo período de tempo em uma mesma classe de berçário. Foram incluídas no estudo 41 crianças *S. mutans* positivas, de 3 a 4 anos de idade, sendo que 16 frequentavam o berçário dia e noite e 25 permaneciam em classe somente durante o dia, cinco dias por semana. Um total de 140 isolados de *S. mutans* foram identificados por testes bioquímicos e genotipados por RFLP e AP-PCR. A maioria das crianças (82,9%) abrigou dois ou mais diferentes genótipos de *S. mutans*, dentre os 88 detectados pela genotipagem. Dois genótipos foram coincidentes entre 13 crianças da classe do berçário dia e noite (81,3%), enquanto que um genótipo idêntico foi compartilhado por apenas duas crianças da classe diurna (8%).

Em sua tese de doutorado, Rubira (2007) estudou, longitudinalmente, tanto a transmissão quanto a estabilidade de colonização de *S. mutans* em um grupo de famílias brasileiras de baixo nível socioeconômico. Participaram da pesquisa 14 famílias constituídas por mãe, pai, um filho primogênito e, quando presente na mesma residência, uma agregada familiar. As mães selecionadas eram primíparas, com ausência de doença sistêmica ou ingestão de medicamentos, possuíam alta contagem de EGM na saliva ($\geq 10^6$ UFC/ml) e mais de 20 dentes na cavidade bucal. Em 4 ocasiões, ao longo de 22 meses, foram realizados exames clínicos e coletas de saliva para avaliar, respectivamente, a experiência de cárie dentária (índices CPO-S e ceo-s) e o nível salivar de EGM. Um total de 551 amostras bacterianas foram isoladas e identificadas como *S. mutans* por meio do método de hibridização DNA-DNA *checkerboard*¹⁶. No decorrer da investigação, somente oito crianças foram colonizadas por *S. mutans*. Dessa forma, foram caracterizados pela AP-PCR os 506 isolados clínicos provenientes das 8 famílias nas quais foram encontrados *S. mutans* em todos os seus membros (8 filhos, seus respectivos pais e 4 avós). A genotipagem detectou diversidade genotípica na população estudada, representada pela presença de um a quatro diferentes genótipos de *S. mutans* nos adultos e de um a dois nas crianças. A ocorrência de transmissão exclusivamente intrafamiliar foi evidenciada pela constatação de que todos os genótipos detectados nas crianças correspondiam a algum dos abrigados pelos indivíduos adultos. O

¹⁶ Método sensível para detecção de microrganismos capaz de avaliar simultaneamente diversas espécies em um grande número de amostras, utilizando genomas inteiros e sondas de DNA marcadas por digoxigenina (ESTRELA, 2005).

compartilhamento de genótipos de *S. mutans* foi observado entre todos os membros de três famílias (37,5%) e entre os cônjuges de todos os casais (100%). Genótipos similares foram encontrados em oito pares mãe-filho (100%), seis pares pai-filho (75%) e três pares avó-criança (75%). Alguns desses genótipos foram estáveis e outros se perderam durante o acompanhamento. A autora concluiu que o fato de genótipos de *S. mutans* terem sido encontrados em todas as famílias, antes de sua detecção na cavidade bucal infantil, suporta a direção única de transmissão de *S. mutans* dos indivíduos adultos para as crianças e que o intenso compartilhamento de genótipos pode favorecer sua contínua reinfecção, diante de uma eventual perda.

A possibilidade de transmissão intrafamiliar também foi abordada por Hameş-Kocabaş et al. (2008) ao estudarem a colonização de *S. mutans* em um grupo de 56 crianças turcas (idade média=33,8 meses) e seus respectivos pais (49 mães e 20 pais). De um a três isolados de *S. mutans* foram obtidos de cada participante, identificados bioquimicamente e genotipados pela AP-PCR. *S. mutans* não foi detectado em todos os indivíduos; assim, a similaridade genotípica foi avaliada em 25 mães, 12 pais e em seus filhos. A possibilidade de transmissão vertical foi revelada em seis pares mãe-filho (24%) e dois pares pai-filho (16,6%). Além disso, não houve compartilhamento de genótipos idênticos de *S. mutans* entre os cônjuges dos casais avaliados. Os autores demonstraram que o nível elevado de *S. mutans* nos pais ($\geq 10^6$ UFC/ml) foi um fator significativo na transmissão de *S. mutans* para as crianças.

Lapirattanakull et al. (2008) estudaram a transmissão vertical de *S. mutans* utilizando um novo método de genotipagem, multilocus sequência de digitação (MLST)¹⁷. Um total de 136 cepas de *S. mutans* foram isoladas de 20 pares mãe-filho japoneses e identificadas quanto à espécie por meio de testes bioquímicos, sorotipagem e PCR específica. Com base na fase da dentição, as crianças foram igualmente categorizadas em dois grupos: dentição decídua (2 anos e 2 meses a 5 anos e 11 meses de idade) ou dentição mista (6 anos e 7 meses a 10 anos e 10 meses de idade). Três isolados de *S. mutans* foram selecionados aleatoriamente de cada participante e submetidos ao MLST. A presença de Sequências Tipos (ST) de nucleotídeos idênticos foi considerado um indicador de

¹⁷ Método de tipagem que examina as sequências nucleotídicas de um conjunto definido de genes constitutivos essenciais (MAIDEN, 2006).

transferência de *S. mutans* nos pares avaliados. A transmissão vertical foi evidenciada em 14 pares mãe-filho (70%) que compartilharam cepas bacterianas com as mesmas STs. Os autores também constataram que a taxa de *S. mutans* transmitidos via materna foi significativamente maior no gênero feminino (90%) do que no masculino (52,9%).

Em um estudo de coorte prospectivo, Alves et al. (2009) avaliaram as potenciais fontes de transmissão de *S. mutans* entre 119 crianças de 28 creches brasileiras. As crianças selecionadas conviviam em diferentes salas de aula, 10 horas por dia, 5 dias por semana. As mesmas foram avaliadas, inicialmente, entre os 5 e 13 meses de idade e após 6, 12 e 18 meses. Exames microbiológicos também foram realizados em 91 cuidadoras, somente no momento em que se detectou a colonização inicial da cavidade bucal das crianças por *S. mutans*. Como controle positivo para a análise da transmissão dos microrganismos, 15 mães de 16 crianças com níveis elevados de *S. mutans* também foram estudadas. Um total de 1392 isolados de *S. mutans* (819 das crianças, 448 das cuidadoras e 125 das mães) foram genotipados pela AP-PCR e por RFLP, para confirmação da identidade genotípica. Em geral, 40,3% das crianças foram colonizadas por *S. mutans* e entre 20 e 35% delas abrigaram mais de um genótipo ao longo do acompanhamento de 1,5 anos. Aproximadamente 22,5% dos genótipos identificados nas crianças, durante as fases iniciais do estudo, foram detectados novamente na coleta de 12 meses. Não foi observada similaridade entre os genótipos de *S. mutans* de nenhum par criança-cuidadora ou entre crianças de creches diferentes. Entretanto, foram verificados indícios de transmissão, tanto horizontal quanto vertical, desde que genótipos idênticos foram encontrados em 16 crianças frequentadoras das mesmas creches e em 8 dos 16 pares mãe-filho analisados (50%).

Mitchell et al. (2009) realizaram múltiplas análises genéticas para constatar evidências de transmissão materna de *S. mutans* em crianças americanas com CPI. Amostras de *S. mutans* foram obtidas de 27 pares mãe-filho e 4 pares de irmãos, compostos por crianças de 18 meses a 6 anos de idade (ceo-d médio=9,7). Os isolados clínicos (seis a oito por participante) foram identificados por PCR em Tempo Real¹⁸ e genotipados pela AP-PCR, a qual detectou uma média de 1,45 e

¹⁸ Técnica de laboratório que combina o princípio da PCR convencional para amplificação de ácidos nucleicos com um mecanismo de quantificação por fluorescência dos fragmentos de DNA e RNA

1,15 genótipos exclusivos de *S. mutans* dentre os isolados maternos e os infantis, respectivamente. Os isolados representativos de cada genótipo foram selecionados e caracterizados por um método complementar de genotipagem, a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)¹⁹, a fim de estabelecer a similaridade genotípica intrafamiliar. A transmissão materna foi verificada em 11 dos 27 pares mãe-filho (41%); sendo que, em 7 pares (26%) todos os genótipos de *S. mutans* adquiridos pela criança corresponderam aos maternos. Esse trabalho também indicou a ocorrência de transmissão horizontal entre irmãos, uma vez que os quatro pares avaliados compartilharam ao menos um genótipo idêntico de *S. mutans*.

Na Argentina, Carletto-Körber et al. (2010) investigaram a transmissão de cepas de *S. mutans* em 17 pares mãe-filho. Trinta e nove isolados bacterianos de todos os participantes *S. mutans* positivos foram obtidos quando a criança estava com 18 meses de idade e identificados, fenotipicamente, com o auxílio de um *kit* comercial de provas bioquímicas. A genotipagem pela AP-PCR revelou alto polimorfismo genético nas cepas de *S. mutans* avaliadas. Dez pares mãe-filho (58,82%) apresentaram similaridade entre os genótipos de *S. mutans* no momento da aquisição inicial, confirmando a mãe como uma importante, mas não exclusiva, fonte transmissora desse microrganismo para as crianças em idade precoce.

Uma possível transmissão de genótipos de *S. mutans* entre alunos de três diferentes escolas americanas foi avaliada por Doméjean et al. (2010). O estudo envolveu 96 crianças (5,2 a 6,5 anos de idade) que frequentavam uma das escolas, aproximadamente 4 horas por dia, 5 dias por semana. Um total de 224 amostras bacterianas foram obtidas dos 47 participantes (49%) infectados por *S. mutans*. A identificação e genotipagem dos isolados clínicos foram realizadas, respectivamente, por testes bioquímicos e pela AP-PCR. Foram detectados 69 diferentes genótipos de *S. mutans*, sendo que as crianças abrigaram até três genótipos em sua cavidade bucal. Um par de crianças, em cada uma das três escolas, compartilhou um genótipo idêntico e exclusivo de *S. mutans*. Os autores ressaltaram que a presença

obtidos. Permite a análise comparativa da expressão de um gene entre as amostras no início da fase exponencial de amplificação (MACKAY, 2004).

¹⁹ Tipo de eletroforese que possibilita a separação de fragmentos de DNA muito maiores do que aqueles separados na eletroforese comum. Ao invés de se aplicar um único campo elétrico uniforme através do gel, são aplicados campos elétricos que se alternam em direções perpendiculares. Dessa forma, fragmentos cromossômicos da amostra de um microrganismo são separados de acordo com seu tamanho, consolidando a cariotipagem eletroforética (ESTRELA, 2005).

de genótipos similares na população estudada confirma a possibilidade de transmissão horizontal dessa espécie bacteriana entre crianças não relacionadas geneticamente.

Na Espanha, Baca et al. (2012) também demonstraram provável ocorrência de transmissão horizontal de *S. mutans* entre alunos de uma mesma classe escolar. Participaram do estudo 42 crianças (idade média=6,8 anos) que frequentavam a escola 6 horas por dia, 5 dias por semana. De um total de 354 isolados bacterianos, 224 foram identificados, por meio de testes bioquímicos, e genotipados, pela AP-PCR. *S. mutans* foi detectado em 30 crianças (71,42%), das quais 20 abrigaram somente um genótipo e o restante, dois genótipos distintos. Os resultados apontaram 11 crianças (36,6%) compartilhando um genótipo de *S. mutans* com no mínimo outro aluno. Dos 34 diferentes genótipos encontrados, 6 (17,64%) foram detectados em mais de uma criança. Com base nesses achados, os autores concluíram que escolares podem ser fonte de transmissão recíproca de *S. mutans*.

Uma efetiva persistência dos genótipos de *S. mutans* transmitidos pelas mães foi verificada por Teanpaisan et al. (2012) ao investigaram a transmissão vertical de *S. mutans* em 37 pares mãe-filho tailandeses. De três a quatro isolados bacterianos foram obtidos de cada participante e genotipados pela AP-PCR. Os autores observaram um padrão distinto de diversidade genotípica de *S. mutans* no grupo avaliado e uma similaridade de genótipos em 28 pares mãe-filho (75,67%), ratificando as genitoras como principal fonte de transmissão de *S. mutans* para seus filhos.

3 PROPOSIÇÃO

Neste estudo, *S. mutans* isolados a partir da saliva dos membros de oito famílias brasileiras foram analisados geneticamente, quanto a alguns de seus fatores de virulência, com os seguintes objetivos:

- Verificar as frequências de detecção dos genes envolvidos na produção de GBPA (*gbpA*) e dos tipos I, II, III e IV de mutacina (*mutAI*, *mutAII*, *mutAIII* e *mutAIV*) em isolados clínicos de *S. mutans*;
- Identificar os genótipos de *S. mutans* mais virulentos dentre aqueles transmitidos dos indivíduos adultos às crianças, compartilhados entre os membros familiares e estáveis na cavidade bucal dos mesmos (RUBIRA, 2007) e,
- Analisar a chance dos genótipos de *S. mutans* mais virulentos serem transmitidos, compartilhados e persistirem colonizando o hospedeiro ao longo do tempo.

As hipóteses nulas (H_0) testadas foram de que:

- Não há associação entre a virulência dos isolados de *S. mutans* e sua capacidade de transmissão, compartilhamento e estabilidade;
- Não há associação entre a prevalência dos genes estudados e a transmissibilidade dos genótipos de *S. mutans* e,
- Não há associação entre a aquisição de genótipos de *S. mutans* mais virulentos e a experiência de cárie dentária da criança.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

Visando o cumprimento dos aspectos éticos e legais, o projeto da presente pesquisa foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOB/USP, obtendo parecer favorável a sua realização (Processo nº 073/2011 - Anexo A).

4.2 LOCAIS DE EXECUÇÃO

Todas as etapas laboratoriais foram realizadas nas dependências do Centro Integrado de Pesquisas e do Laboratório de Farmacologia da FOB/USP (Anexo B), por um único pesquisador previamente treinado.

4.3 ESTUDO PILOTO

Com a finalidade de validar a metodologia, testando os procedimentos metodológicos e corrigindo eventuais falhas, foi realizado um estudo piloto em amostragem randomizada (N=20) correspondente a aproximadamente 5% da amostra total. A randomização foi realizada por meio de sorteio aleatório, utilizando-se o programa Microsoft® Excel 2003 (Microsoft Corporation, Seattle, WA, EUA).

4.4 AMOSTRA

O material biológico utilizado no presente estudo é oriundo da pesquisa desenvolvida por Rubira (2007). Foram utilizadas 393 amostras de *S. mutans* previamente cultivados e isolados a partir da saliva de 20 indivíduos adultos cárie-ativos. Estes consistiam em membros (oito mães, oito pais e quatro avós) de oito

famílias brasileiras de baixo nível socioeconômico (Tabela 1). Os isolados bacterianos encontravam-se estocados a -86°C em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) contendo glicerol a 20%. Os mesmos já haviam sido identificados em relação à espécie *S. mutans* por meio do método de hibridização DNA-DNA *checkerboard* e genotipados pela AP-PCR, utilizando-se o *primer* arbitrário OPA-02 (RUBIRA, 2007).

Tabela 1 - Caracterização dos indivíduos adultos pertencentes às oito famílias estudadas

Família	Membro					
	Mãe*		Pai		Avó	
	Idade	CPO-S	Idade	CPO-S	Idade	CPO-S
1	16	22	23	21	43	87
2	18	12	25	24	49	47
4	23	20	24	34	51	59
5	21	24	20	19	NT	NT
7	19	24	20	5	NT	NT
8	18	9	25	17	NT	NT
10	17	9	18	8	36	62
12	23	42	31	20	NT	NT
Média ± DP	19,37 ± 2,66	20,25 ± 10,85	23,25 ± 4,06	18,5 ± 9,05	44,75 ± 6,75	63,75 ± 16,80

Fonte: Adaptado de Rubira (2007)

NT- Não tem; DP- Desvio Padrão

* Todas as mães eram primíparas e com nível salivar de estreptococos do grupo *mutans* $\geq 10^6$ UFC/ml

Na investigação inicial (RUBIRA, 2007), ao longo de 22 meses, os pares mãe-filho foram examinados para determinação da prevalência de cárie dentária (índices ceo-s e CPO-S) em quatro visitas domiciliares (V); no momento em que o filho primogênito estava com a idade de 7-8 meses (V1), 11-12 meses (V2), 17-19 meses (V3) e 29-30 meses (V4). Nessas ocasiões, foram coletadas amostras de saliva de todos os membros familiares nas duas primeiras visitas, somente das crianças na V3 e dos pares mãe-filho na V4. Uma vez que no final do acompanhamento (V4) os genótipos de *S. mutans* abrigados pelas mães foram similares aos detectados nos exames iniciais e todos os genótipos adquiridos pelas crianças foram idênticos aos de suas respectivas genitoras (Anexo C), a seleção da amostra para o presente trabalho limitou-se aos isolados clínicos de *S. mutans* obtidos dos participantes adultos nas duas primeiras visitas (V1 e V2) (Tabela 2). É

importante salientar que em virtude da ocorrência do compartilhamento de genótipos entre os membros familiares, o uso do termo “transmissão” foi restrito à transferência dos microrganismos dos indivíduos adultos para as crianças.

Tabela 2 - Distribuição por participante do número de amostras utilizadas no presente estudo (N=393)

Família	Membro			Total
	Mãe	Pai	Avó	
1	20	20	19	59
2	20	20	20	60
4	19	20	20	59
5	19	20	NT	39
7	20	20	NT	40
8	20	20	NT	40
10	20	18	18	56
12	20	20	NT	40
Total	158	158	77	393

NT- Não tem

4.5 ETAPAS LABORATORIAIS

4.5.1 Cultivo e Repique de *S. mutans*

Devido ao longo período de armazenamento dos isolados de *S. mutans*, o primeiro procedimento realizado consistiu na reativação dos microrganismos em diferentes meios de cultura para verificação da viabilidade dos mesmos.

Em capela de fluxo laminar e utilizando-se uma alça de platina calibrada, 10 µL de cada amostra descongelada e homogeneizada foi semeada em estria em placas de Petri (90X15 mm) contendo o meio de cultura ágar sangue (BioCen do Brasil, Campinas, SP, Brasil) e em placas (Interlab Distribuidora de Produtos Científicos SA, São Paulo, SP, Brasil) contendo o meio seletivo ágar Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose (MSBS) (ágar Mitis Salivarius acrescido de bacitracina 0,2 U/mL e sacarose 20%) (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973) (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) (Apêndice A). As placas foram acondicionadas na posição

invertida, em jarras de anaerobiose (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), e incubadas sob condições de microaerofilia (chama de vela) em estufa a 37°C, durante 72 horas. Após esse período, realizou-se a identificação presuntiva da espécie *S. mutans* baseada na morfologia e pureza da cultura microbiana (Figura 1).

Com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Olympus - Modelo SZ 40, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan), observou-se a viabilidade das amostras, indicada pela presença de crescimento bacteriano com características morfológicas de *S. mutans* tanto no ágar sangue (alfa-hemólise ou gama-hemólise) quanto no ágar MSBS (pequenas colônias de coloração negra, rugosas, convexas, fortemente aderidas ao substrato, com bordas irregulares e morfologia semelhante a uma amora) (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973; DE LORENZO, 2004) (Figuras 2a e 2b).

Para uma análise complementar, foram preparadas lâminas pelo método da coloração de Gram com esfregaços de colônias sugestivas de *S. mutans*. A confirmação da espécie bacteriana ocorreu diante da visualização em microscópio óptico (Olympus - Modelo CH2, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan) de cocos Gram-positivos (arroxeados), ovalados e dispostos isoladamente, em diplococos, formando cadeias ou pequenas massas (LÖESCHE, 1986; DE LORENZO, 2004) (Figura 2c).

Uma colônia representativa de *S. mutans* de cada placa de ágar MSBS foi selecionada e transferida assepticamente para um tubo de cultura contendo 5 mL de caldo BHI (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) (Apêndice B) (Figuras 3a, 3b e 3c). Os tubos foram incubados em jarras de anaerobiose e mantidos em estufa por 48 horas, sob condições de microaerofilia a 37°C. Uma vez observado o crescimento bacteriano no material repicado (Figura 3d), 500 µL foram suspensos em glicerol a 20% e congelados a -80°C. Da mesma forma, alíquotas de 1.000 µL foram distribuídas em tubos *Eppendorf* de 2 mL e conservadas em temperatura ambiente, por no máximo 24 horas, até a realização da próxima etapa.

Figura 1 - Cultivo dos isolados bacterianos: Amostra de *S. mutans* congelada (a); Ágar MSBS (b); Semeadura em estria (c); Aspecto macroscópico das colônias após 72 horas (d)

Figura 2 - Padrão morfológico de crescimento bacteriano encontrado nas amostras de *S. mutans* cultivados em ágar MSBS: Microscópio estereoscópio com aumento de 30X (a) e 50X (b). A seta indica gotícula cintilante de polissacarídeo extracelular no topo de uma colônia. Coloração de Gram: Microscópio óptico com objetiva de imersão 100X (c)

Figura 3 - Repique das colônias de *S. mutans*: Caldo BHI com coloração original amarela e límpida (a); Seleção de uma colônia (b); Inoculação no meio de cultura líquido (c); Crescimento bacteriano (d). Observar aspecto turvo do conteúdo do tubo

4.5.2 Extração do DNA Bacteriano

Para a extração do DNA cromossômico bacteriano foi utilizado o mini *Kit* QIAamp DNA (Qiagen, Valencia, CA, EUA) (Figura 4a) de acordo com as instruções do fabricante e seguindo o protocolo referente à manipulação de bactéria Gram-positiva.

Inicialmente, os tubos *Eppendorf* contendo o crescimento bacteriano, foram centrifugados em temperatura ambiente por 10 minutos a 7.500 rpm (Centrífuga 5417R, Eppendorf, Hamburg, Germany) (Figuras 4b e 4c). Após descarte do sobrenadante, o *pellet* bacteriano foi suspenso em 180 µL de uma solução tampão enzimática (20 mg/mL lisozima, 2 mM EDTA, 1,2% Triton® X-100, 20 mM Tris-HCl pH 8,0) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (Apêndice C) que atua na lise da rígida parede celular bacteriana. As amostras foram homogeneizadas em agitador tipo Vortex (Quimis, Diadema, SP, Brasil) e incubadas em banho-maria (Fanem - Modelo 100, Guarulhos, SP, Brasil) (Figura 4d) por 40 minutos a 37°C. Em seguida, foram acrescentados 20 µL da proteinase K e 200 µL da solução tampão AL (ambas fornecidas pelo *kit*). Os tubos *Eppendorf* foram novamente agitados e incubados em banho-maria por 30 minutos a 56°C e por 15 minutos a 95°C. Após uma breve centrifugação (1 minuto, 7.500 rpm, 25°C), foram adicionados 200 µL de álcool etílico absoluto, obtendo-se a precipitação do DNA na solução.

Todo o conteúdo de cada tubo *Eppendorf* foi transferido para uma coluna contendo um filtro e encaixadas em um tubo coletor de 2 mL (fornecidos pelo *kit*). Posteriormente, os conjuntos (coluna + tubo coletor) foram centrifugados (2 minutos, 8.000 rpm, 25°C) e a coluna com o filtro foi transferida para um novo tubo coletor, onde foram acrescentados 500 µL da solução tampão AW1 (fornecida pelo *kit*). As amostras foram submetidas à nova centrifugação (2 minutos, 8.000 rpm, 25°C) e cada coluna com o filtro foi transferida para outro tubo coletor. Da mesma forma, foram adicionados 500 µL da solução tampão AW2 (fornecida pelo *kit*), seguida de centrifugação (3 minutos, 14.000 rpm, 25°C).

Enfim, as colunas com os respectivos filtros foram transferidas para um novo tubo *Eppendorf* de 2 mL, onde foram adicionados 200 µL da solução tampão AE (fornecida pelo *kit*) para extração do DNA preso ao filtro. As amostras foram mantidas por seis minutos em temperatura ambiente e novamente centrifugadas (2

minutos, 8.000 rpm, 25°C). Após repetição desse último ciclo, as colunas foram eliminadas, restando os tubos *Eppendorf* contendo uma amostra do DNA cromossômico de cada isolado bacteriano (Figura 4e).

Sequencialmente, o grau de pureza e a concentração do material genético extraído foram determinados por espectrofotometria (Espectrofotômetro NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) (Figura 4f). Sua pureza foi considerada adequada quando as amostras de DNA apresentaram razão A260 nm/A280 nm entre 1,8 e 2,0. Valores acima desse intervalo sugerem contaminação por RNA e valores abaixo indicam contaminação proteica (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Por meio de processos de diluição do DNA em água ultrapura (Apêndice D), as amostras foram padronizadas a uma concentração final de 15 ng/μL e armazenadas a -20°C.

Figura 4 - Extração do DNA cromossômico bacteriano: *Kit* comercial utilizado (a); Criotubo contendo o crescimento bacteriano em caldo BHI (b); Centrifugação das amostras (c); Incubação em banho-maria (d); DNA extraído (e); Espectrofotômetro (f)

4.5.3 Análises Genético-Moleculares dos Fatores de Virulência de *S. mutans*

4.5.3.1 Detecção do gene envolvido na produção de GbpA por *S. mutans*

As amostras de DNA cromossômico bacteriano foram amplificadas pela PCR utilizando-se *primers* específicos que flanqueiam o gene *gbpA*, codificador da proteína GbpA (Quadro 1).

Primer	Sequência	pb*	Gen Bank	Referência
<i>gbpA-Forward</i>	5'- TAGATATCCGACAATTTGCAAGTAATA GAAGT-3'	2.100	M30945	Banas et al. (2007)
<i>gbpA-Reverse</i>	5'- TAGATATCCGTTATCATACGACGACAT ACAA-3'			

* Tamanho do fragmento em pares de base

Quadro 1 - *Primers* utilizados na análise genético-molecular do gene *gbpA*

Cada mistura da PCR, em um volume de reação de 25 µL, consistiu de: 2,5 µL de Tampão 10X (Tris-HCl 10 mM; KCl 50 mM pH 8,0), 0,75 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µL de dNTPs (0,2 mM), 0,2 µL de *primer Forward* (0,4 µM), 0,2 µL de *primer Reverse* (0,4 µM), 0,25 µL de Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase (1,25U) (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil), 15,6 µL de água ultrapura e 5 µL do DNA bacteriano (Apêndice E). As PCRs foram otimizadas com o uso de uma cepa padrão de *S. mutans* UA159 (ATCC 700610), gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia da FOB/USP, como controle positivo (C⁺). E, para assegurar a ausência de DNA contaminante, incluiu-se uma amostra contendo água ultrapura como controle negativo (C⁻) em cada reação (Figuras 5a e 5b).

As condições das PCRs foram realizadas em um termociclador (Applied Biosystems - Modelo Veriti 96, Foster City, CA, EUA) (Figura 5c) com desnaturação inicial das fitas de DNA a 95°C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos subsequentes de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos *primers* a 59°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. O término da termociclagem ocorreu com uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,75% (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil) (Apêndice F), submerso em tampão de corrida TBE 1X (Tris-Borato-EDTA pH 8,0). As corridas eletroforéticas foram realizadas em cuba horizontal (Loccus Biotecnologia - Modelo LCH 12X14, Cotia, SP, Brasil) mantendo-se a corrente constante a 100V (Loccus Biotecnologia - Modelo LPS 300V, Cotia, SP, Brasil) (Figuras 5d e 5e). Os géis foram corados com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen Life Technologies, Eugene, OR, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta, utilizando-se como referência um marcador de peso molecular de 250 pb (DNA Ladder - Invitrogen Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil). As imagens dos géis foram captadas por um sistema de fotodocumentação (Sigma Chemical Company - Modelo T2202, St. Louis, MO, EUA) (Figura 5f) e armazenadas no formato *Joint Photographic Experts Group* (JPEG). As análises das bandas foram conduzidas por comparação visual e a confirmação da presença do gene *gbpA* ocorreu diante da amplificação e visualização de uma única banda de 2.100 pb.

Figura 5 - PCR e análise do DNA por eletroforese em gel de agarose: Reagentes da PCR (a); Montagem das placas com as misturas das reações (b); Termociclador (c); Carregamento no gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR (d); Corrida eletroforética (e); Sistema de fotodocumentação (f)

4.5.3.2 Detecção dos genes envolvidos na produção de mutacinas por *S. mutans*

As amostras de DNA cromossômico bacteriano também foram amplificadas pela PCR utilizando-se *primers* específicos que flanqueiam os genes *mutA*, codificadores dos tipos I, II, III e IV de mutacinas (Quadro 2). Apenas um par de *primers* foi selecionado para detectar os genes *mutAI* e *mutAIII* devido à alta homologia entre os mesmos (QI; CHEN; CAULFIELD, 1999, 2000).

Primer	Sequência	pb*	Gen Bank	Referência
<i>mutAI/III-Forward</i>	5'-AGTTTCAATAGTTACTGTTGC-3'	700/ 450	AF267498/A F154675	Qi, Chen e Caulfield (1999; 2000)
<i>mutAI/III-Reverse</i>	5'-GCCAAACGGAGTTGATCTCGT-3'			
<i>mutAII-Forward</i>	5'-AACGCAGTAGTTTCTTTGAA	444	U40620	Novák, Caulfield e Miller (1994)
<i>mutAII-Reverse</i>	5'-TTCCGGTAAGTACATAGTGC-3'			
<i>mutAIV-Forward</i>	5'-ATGGGATATTTAAAGGGAAA-3'	1344	AF238860	Qi, Chen e Caulfield (2001)
<i>mutAIV-Reverse</i>	5'-TCAGAGCAGCTACAAAAACT-3'			

*Tamanho do fragmento em pares de base

Quadro 2 - *Primers* utilizados na análise genético-molecular dos genes *mutAI*, *mutAII*, *mutAIII* e *mutAIV*

Cada mistura da PCR, em um volume de reação de 25 µL, consistiu de: 2,5 µL de Tampão 10X (Tris-HCl 10 mM; KCl 50 mM pH 8,0), 0,75 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µL de dNTPs (0,2 mM), 0,2 µL de *primer Forward* (0,4 µM), 0,2 µL de *primer Reverse* (0,4 µM), 0,25 µL de Platinum® Taq DNA Polymerase (1,25U) (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil), 15,6 µL de água ultrapura e 5 µL do DNA bacteriano. Utilizou-se como C⁺ das PCRs do gene *mutAIV* e das demais mutacinas, respectivamente, a cepa padrão UA159 (ATCC 700610) e uma cepa controle de *S. mutans* detectada no estudo piloto. Em cada reação também foi incorporada uma amostra contendo água ultrapura como C⁻.

A termociclagem foi realizada com protocolo de desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, seguida de 40 ciclos subsequentes a 95°C por 15 segundos, anelamento dos *primers* a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos de amplificação do DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% conforme descrito para o gene *gpbA*, sendo que a confirmação da presença dos genes *mutAI*, *mutAII*, *mutAIII* e *mutAIV* ocorreu quando foram amplificadas e visualizadas bandas de 700, 444, 450 e 1.344 pb, respectivamente.

4.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos foram codificados para todas as variáveis e categorias estudadas e analisados por meio das estatísticas descritiva e inferencial. Neste caso, utilizou-se o programa SPSS® (*Statistical Package for Social Scientists*) versão 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) considerando, em todos os testes, um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

As frequências absoluta e relativa de detecção dos genes *gpbA*, *mutAI*, *mutAII*, *mutAIII* e *mutAIV* nos isolados clínicos de *S. mutans* foram apresentados sob a forma de um gráfico de histograma.

Os dados relativos à caracterização dos genótipos de *S. mutans* transmitidos, compartilhados e estáveis e, à identificação dos mais virulentos foram sumarizados em tabelas descritivas. Os genótipos de *S. mutans* previamente detectados por Rubira (2007) foram agrupados em diferentes classes de virulência (0, 1, 2, 3, 4 e 5), de acordo com o número de genes detectados, e aqueles pertencentes às classes 3, 4 e 5 foram considerados os mais virulentos. Com o intuito de facilitar o entendimento, os genótipos foram designados por sua letra correspondente seguida do número da família na qual o mesmo foi detectado. Por exemplo, o genótipo A-1 refere-se ao genótipo A da família 1.

O teste de Qui Quadrado foi utilizado tanto para avaliar a associação entre a virulência dos isolados de *S. mutans* e sua capacidade de transmissão, compartilhamento e estabilidade, quanto para verificar diferença nas prevalências dos genes estudados entre os genótipos transmitidos e não transmitidos.

A análise da chance dos genótipos de *S. mutans* identificados como os mais virulentos serem transmitidos, compartilhados e persistirem na cavidade bucal dos membros familiares foi verificada pelo *Odds Ratio*.

Finalmente, por meio do teste exato de Fisher avaliou-se a associação entre a aquisição de genótipos de *S. mutans* mais virulentos e a experiência de cárie dentária das crianças.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Dos 393 isolados clínicos de *S. mutans*, 392 (99,7%) foram reativados com sucesso em ambos os meios de cultura utilizados. Uma amostra obtida do pai da família 4 foi considerada inviável e, conseqüentemente, excluída da pesquisa. Em duas tentativas, a mesma apresentou colônias beta-hemolíticas quando semeada no ágar sangue e ausência de crescimento bacteriano no ágar MSBS. O Gráfico 1 registra o número de isolados viáveis de *S. mutans* entre os membros das oito famílias avaliadas. De cada participante foram investigadas de oito a dez amostras por visita.

Gráfico 1 - Distribuição das amostras de *S. mutans* analisadas geneticamente, de acordo com sua origem (N=392)

Todos os isolados viáveis amplificaram ao menos um dos genes de virulência analisados pelas reações de PCR com os *primers* específicos. Conforme exposto no Gráfico 2, os genes codificadores das mutacinas tipos IV e I foram, respectivamente, os mais (89,8%) e menos (12,5%) prevalentes nas amostras estudadas.

Gráfico 2 - Frequências absoluta e relativa (%) de detecção dos genes *gpbA*, *mutAI*, *mutAII*, *mutAIII* e *mutAIV* nas amostras estudadas (N=392)

Imagens fotográficas de perfis eletroforéticos dos produtos da amplificação dos genes *gpbA*, *mutAI*, *mutAII*, *mutAIII* e *mutAIV* estão exemplificadas nas Figuras 6 a 10. Nestas ilustrações pode-se visualizar as bandas correspondentes aos tamanhos dos fragmentos de DNA de cada gene.

Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 0,75% da amplificação por PCR do gene *gpbA* (2.100 pb) em *S. mutans* isolados dos membros da família 2. Coluna 1 - marcador de peso molecular de 250 pb; Coluna 2 - controle positivo da reação; Coluna 7 - controle negativo da reação; Colunas 3 a 6 - isolados da mãe; Colunas 8 e 9 - isolados do pai; Colunas 10 e 11 - isolados da avó

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% da amplificação por PCR dos genes *mutAI* (700 pb) e *mutAIII* (450 pb) em *S. mutans* isolados de membros de diferentes famílias. Coluna 1 - marcador de peso molecular de 250 pb; Colunas 2 e 3 - isolados da mãe da família 1; Colunas 4 e 5 - isolados da avó da família 1; Colunas 6 e 7 - isolados da mãe da família 2; Colunas 8 a 10 - isolados da avó da família 2

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% da amplificação por PCR do gene *mutAII* (444 pb) em *S. mutans* isolados dos membros da família 4. Coluna 1 - marcador de peso molecular de 250 pb; Coluna 2 - controle positivo da reação; Coluna 3 - controle negativo da reação; Colunas 4 a 7 - isolados da mãe; Colunas 8 a 10 - isolados do pai; Colunas 11 e 12 - isolados da avó

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% da amplificação por PCR do gene *mutAIV* (1.344 pb) em *S. mutans* isolados dos membros da família 7. Coluna 1 - marcador de peso molecular de 250 pb; Coluna 2 - controle positivo da reação; Coluna 3 - controle negativo da reação; Colunas 4 a 9 - isolados do pai; Colunas 10 a 12 - isolados da mãe

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% das amplificações por PCR dos cinco genes analisados em isolados de *S. mutans*. Coluna 1 - marcador de peso molecular de 250 pb; Coluna 2 - banda referente ao gene *mutAI* (700 pb); Coluna 4 - bandas referentes aos genes *mutAI* (700 pb) e *mutAIII* (450 pb); Coluna 6 - banda referente ao gene *mutAII* (444 pb); Coluna 8 - banda referente ao gene *mutAIV* (1.344 pb); Coluna 10 - banda referente ao gene *gbpA* (2.100 pb); Colunas 3, 5, 7, 9 e 11 - controles negativos das respectivas reações

Um total de nove tipos de combinações diferentes entre os genes detectados foram identificadas e agrupadas nas classes de virulência correspondentes (Tabela 3). As classes 0 e 5 não tiveram representantes, uma vez que os isolados de *S. mutans* amplificaram no máximo quatro dos cinco genes estudados. Uma análise mais criteriosa da mesma tabela revela o enquadramento de 188 (48%) isolados nas classes mais virulentas (3 e 4) e de 204 (52%) nas classes menos virulentas (1 e 2).

Tabela 3 - Composição das classes de virulência de acordo com o número de isolados de *S. mutans* e combinações de genes detectados

Classe de virulência	Número de isolados (%)	Combinação de genes				
		<i>gbpA</i>	<i>mutAI</i>	<i>mutAII</i>	<i>mutAIII</i>	<i>mutAIV</i>
1	47 (12)	-	-	+	-	-
		-	-	-	-	+
2	157 (40)	+	-	-	-	+
		-	-	+	-	+
		+	-	+	-	-
3	140 (35,7)	+	-	-	+	+
		+	-	+	-	+
		-	+	-	+	+
4	48 (12,2)	+	+	-	+	+
Total	392 (100)					

+ Presença do gene; - Ausência do gene

O conjunto de isolados clínicos utilizados na presente pesquisa (N=392) abrangeu todos os 24 diferentes genótipos de *S. mutans* previamente detectados por Rubira (2007) na amostragem inicial. Onze desses genótipos (45,8%) foram identificados como os mais virulentos por pertencerem às classes de virulência 3 e 4 (Tabela 4). Esta tabela também qualifica, quanto à virulência, os genótipos de *S. mutans* e aponta, em cada família, aqueles que foram transmitidos dos indivíduos adultos às crianças, os compartilhados por no mínimo dois participantes da mesma família e os que se mantiveram estáveis na cavidade bucal de ao menos um membro familiar. Observa-se que 6 dos 11 genótipos transmitidos, 10 dos 23 compartilhados e 8 dos 17 estáveis corresponderam a um genótipo familiar de maior virulência.

Tabela 4 - Caracterização dos 24 diferentes genótipos de *S. mutans* detectados nas oito famílias estudadas

Família	Genótipos	Genótipos transmitidos	Genótipos compartilhados	Genótipos estáveis ^E
1	A*,B	A*	A*,B	A*,B
2	A,B*,C*	A,B*	A,B*,C*	A,B*,C*
4	A*,B,C	A*,B	A*,B,C	A*,B,C
5	A*,B	A*	A*,B	A*,B
7	A,B,C*,D	A,B	A,B,C*,D	A
8	A*,B	A*	A*,B	A*
10	A*,B,C,D*,E*	A*	A*,B,C,D*	A*,B
12	A,B*,C	A	A,B*,C	A,B*,C
Total	24 (100%)	11 (54,5%)	23 (95,8%)	17 (70,8%)

* Genótipos identificados como os mais virulentos

^E Genótipos detectados em ao menos duas visitas

Letras maiúsculas idênticas na mesma coluna indicam os diferentes genótipos detectados em cada família

Letras maiúsculas idênticas na mesma linha indicam genótipos similares dentro da família

As características dos 11 genótipos de *S. mutans* identificados como os mais virulentos encontram-se compiladas na Tabela 5. Dentre eles, foram encontrados padrões genéticos bastante similares em relação aos fatores de virulência avaliados. Os dois genótipos representantes da classe 4 apenas não amplificaram o gene codificador da mutacina tipo II e a maioria dos genótipos pertencentes à classe 3 apresentaram a mesma combinação de genes detectados (*gbpA*, *mutAll* e *mutAIV*). De uma forma geral, em todos esses genótipos foi verificada a presença do gene *mutAIV* associado a, no mínimo, outros dois genes

envolvidos na produção de mutacinas. O genótipo E-10 foi o único negativo para o gene *gbpA* e não compartilhado entre os membros familiares.

Tabela 5 - Descrição dos 11 genótipos de *S. mutans* identificados como os mais virulentos

Genótipo	Classe de virulência	Combinação de genes					T	C	E
		<i>gbpA</i>	<i>mutAI</i>	<i>mutAII</i>	<i>mutAIII</i>	<i>mutAIV</i>			
A-1	4	+	+	-	+	+	S	S	S
B-2	3	+	-	-	+	+	S	S	S
C-2	3	+	-	+	-	+	N	S	S
A-4	3	+	-	+	-	+	S	S	S
A-5	3	+	-	+	-	+	S	S	S
C-7	3	+	-	+	-	+	N	S	?
A-8	3	+	-	+	-	+	S	S	S
A-10	4	+	+	-	+	+	S	S	S
D-10	3	+	-	+	-	+	N	S	N
E-10	3	-	+	-	+	+	N	N	?
B-12	3	+	-	+	-	+	N	S	S

T- Transmissão do genótipo para a criança; C- Compartilhamento do genótipo por no mínimo dois membros da mesma família; E- Estabilidade do genótipo em ao menos um membro familiar

+ Presença do gene; - Ausência do gene; S- Sim; N- Não; ?- Não foi possível determinar a estabilidade

A visão geral do acompanhamento longitudinal dos diferentes genótipos de *S. mutans*, entre os membros familiares, está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Distribuição intrafamiliar dos genótipos de *S. mutans* no decorrer das visitas (Adaptada de Rubira, 2007)

Família	Mãe			Pai		Avó		Criança			
	V1	V2	V4	V1	V2	V1	V2	V1	V2	V3	V4
1	A*,B	B	A*,B	A*	A*	A*	A*,B	#	#	A*	A*
2°	A	B*	A,B*	A,B*,C*	A,B*,C*	A,B*,C*	A,B*,C*	#	A,B*	A	A,B*
4°	A*,C	A*,C	A*,B,C	A*,B,C	A*,B	A*,B,C	A*,B,C	#	#	A*,B	A*,B
5°	A*,B	A*,B	A*,B	A*,B	A*,B	NT	NT	#	#	#	A*
7	A,D	A,B,C*	f	C*,D	f	NT	NT	#	A,B	#	f
8	A*,B	A*,B	A*	A*	A*,B	NT	NT	#	#	#	A*
10	A*,B,C	A*,B	C	B,D*	B,C	B	B,C,D*,E*§	#	#	#	A*
12	A,B*,C	B*,C	f	A,B*	A,C	NT	NT	#	#	#	A

V1- 1ª visita (criança com 7-8 meses); V2- 2ª visita (11-12 meses); V3- 3ª visita (17-19 meses); V4- 4ª visita (29-30 meses)

NT- Não tem; f- Faltou à visita; # Cultura negativa para estreptococos do grupo *mutans*

* Genótipos identificados como os mais virulentos; § Genótipo não compartilhado

Letras maiúsculas idênticas na mesma coluna indicam os diferentes genótipos detectados em cada família

Letras maiúsculas idênticas na mesma linha indicam genótipos similares dentro da família

° Famílias nas quais a criança apresentou cárie dentária no final do acompanhamento (V4)

A virulência do *S. mutans* apresentou associação com sua transmissibilidade ($P<0,001$) e com a estabilidade da colonização ($P=0,011$), mas não influenciou o compartilhamento dessa espécie bacteriana entre os membros familiares. Os genótipos de *S. mutans* mais virulentos apresentaram aproximadamente três vezes mais chance de serem transmitidos e aproximadamente duas vezes mais chance de persistirem na cavidade bucal do que os menos virulentos (Tabela 7).

Tabela 7 - Associação entre a virulência dos isolados de *S. mutans* e a transmissão, compartilhamento e estabilidade dos genótipos

Variáveis		Classes de virulência ¹		OR (IC95%)	P
		3 e 4	1 e 2		
Transmissão	Sim	130 (69,1)	86 (42,2)	3,07 (2,02 - 4,66)	<0,001*
	Não	58 (30,9)	118 (57,8)		
Compartilhamento	Sim	187 (99,5)	204 (100,0)	—	0,297
	Não	1 (0,5)	0 (0,0)		
Estabilidade	Sim	167 (88,8)	162 (79,4)	2,06 (1,17 - 3,63)	0,011*
	Não	21 (11,2)	42 (20,6)		

OR- Odds Ratio; IC95%- Intervalo de Confiança de 95%

P- Significância obtida a partir do teste de Qui Quadrado ($P<0,05$)

¹ Frequências absoluta e relativa (%) do número de isolados de *S. mutans*

* Associação estatisticamente significativa

— Valores não obtidos em virtude da ausência de amostras em uma categoria

A Tabela 8 contempla os padrões de detecção dos genes de virulência nos genótipos de *S. mutans* adquiridos ou não pelas crianças. Houve diferença na prevalência dos genes *mutAI* ($P<0,001$) e *mutAIII* ($P<0,001$) entre os isolados clínicos correspondentes aos genótipos transmitidos e não transmitidos. Todavia, pelo teste exato de Fisher não foi detectada associação ($P=0,357$) entre a experiência de cárie dentária da criança e a virulência do genótipo transmitido. Embora 6 das 8 crianças (75%) (famílias 1, 2, 4, 5, 8 e 10) tenham adquirido ao menos um genótipo de *S. mutans* mais virulento, três delas (famílias 2, 4 e 5) desenvolveram a doença aos 29-30 meses de idade.

Tabela 8 - Distribuição, quanto à transmissibilidade, dos 24 diferentes genótipos de *S. mutans*

	Família	Genótipo	Número de isolados	Genes detectados				
				<i>gbpA</i>	<i>mutA</i> ^a	<i>mutAII</i>	<i>mutAIII</i> ^a	<i>mutAIV</i>
TRANSMITIDOS	1	A*	40	+	+	-	+	+
	2°	A	27	+	-	-	-	+
		B*	16	+	-	-	+	+
	4°	A*	20	+	-	+	-	+
		B	19	-	-	+	-	+
	5°	A*	23	+	-	+	-	+
	7	A	17	+	-	+	-	-
		B	6	-	-	+	-	+
	8	A*	23	+	-	+	-	+
	10	A*	8	+	+	-	+	+
12	A	17	-	-	-	-	+	
Total de isolados (%)			216 (100%)	174 (80,5%)	48 (22,2%)	108 (50%)	64 (29,6%)	199 (92,1%)
NÃO TRANSMITIDOS	1	B	19	+	-	-	-	+
	2	C*	17	+	-	+	-	+
	4	C	19	+	-	-	-	+
	5	B	16	-	-	+	-	+
	7	C*	12	+	-	+	-	+
		D	5	-	-	+	-	-
	8	B	17	+	-	+	-	-
	10	B	25	-	-	-	-	+
		C	14	+	-	-	-	+
		D*	8	+	-	+	-	+
		E*	1	-	+	-	+	+
	12	B*	14	+	-	+	-	+
		C	9	+	-	-	-	+
Total de isolados (%)			176 (100%)	129 (73,3%)	1 (0,57%)	89 (50,6%)	1 (0,57%)	154 (87,5%)

+ Presença do gene; - Ausência do gene

* Genótipos identificados como os mais virulentos

° Famílias nas quais a criança apresentou cárie dentária no final do acompanhamento (V4)

^a Genes em que houve diferença entre os grupos evidenciada pelo teste de Qui Quadrado ($P < 0,05$)

Letras maiúsculas idênticas na mesma coluna indicam os diferentes genótipos detectados em cada família

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Uma avaliação prévia da viabilidade celular é essencial para a condução de pesquisas confiáveis que utilizam microrganismos estocados por longos períodos de tempo. De acordo com Sola et al. (2012), a garantia de sobrevivência de culturas bem como a conservação de suas características morfológicas, fisiológicas e genéticas são primordiais para a preservação do crescimento microbiano, uma vez que diferentes condições de armazenamento podem afetar a sobrevivência celular.

Diante da necessidade de reativação de um grupamento bacteriano ou de apenas uma bactéria em particular, deve-se optar por um meio de cultura seletivo, em cuja formulação existam componentes que permitam quase que exclusivamente o desenvolvimento do grupo ou espécie-alvo (JAWETZ; MELNICK; ADELBURG, 2000; DE LORENZO, 2004). Dessa forma, apesar da literatura apontar diferentes meios de cultura para o isolamento de *S. mutans* (TANZER et al., 1984; HIRASAWA; TAKADA, 2003; KOMIYAMA et al., 2003), o meio MSBS ainda é o mais indicado para essa finalidade (CARIS et al., 2005). Sua capacidade seletiva foi aqui demonstrada pelo crescimento de *S. mutans* em quase a totalidade (99,7%) das amostras semeadas, as quais encontravam-se armazenadas a -86°C, por aproximadamente oito anos.

S. mutans, principal patógeno relacionado à cárie dentária, expressa diversos genes de virulência que influenciam seu crescimento e acúmulo na superfície dos dentes. No presente estudo, os genes *gbpa*, *mutAI*, *mutAII*, *mutAIII* e *mutAIV* foram detectados, respectivamente, em 77,3%, 12,5%, 51%, 16,6% e 89,8% dos isolados de *S. mutans* viáveis (Gráfico 2). Entretanto, este é o primeiro relato acerca da prevalência do gene *gbpa* em isolados clínicos de *S. mutans*, impossibilitando a realização de análises comparativas. As pesquisas precedentes são estritamente laboratoriais e avaliaram o significado clínico da GBPA por meio da deleção de seu gene codificador em cepas de referência (HAZLETT; MICHALEK; BANAS, 1998; HAZLETT; MAZURKIEWICZ; BANAS, 1999; MATSUMURA et al., 2003; MATSUMOTO-NAKANO; FUJITA; OOSHIMA, 2006, 2007; LYNCH et al., 2007).

Por outro lado, a literatura reporta diferentes frequências de detecção dos genes *mutAI* (29,1% a 53%), *mutAII* (<10% a 80%), *mutAIII* (12,7%) e *mutAIV* (18,7 a 70%) em *S. mutans* isolados a partir do biofilme dentário e/ou saliva humana (QI; CHEN; CAUFIELD, 2001; LONGO; MATTOS-GRANER; MAYER, 2003; KAMIYA et al., 2005b; KRETH et al., 2005b; KAMIYA; HÖFLING; GONÇALVES, 2008; RODRIGUES et al., 2008; VALARINI et al., 2009; BALLINI, 2011). Essa variabilidade advém, provavelmente, de diferenças metodológicas entre os estudos, principalmente em relação ao perfil da população, número de amostras avaliadas e *primers* utilizados.

Ao contrário do observado neste trabalho, o gene envolvido na produção da mutacina tipo I foi o mais prevalente na pesquisa de Kamiya, Höfling e Gonçalves (2008). Esses autores detectaram a presença dos genes *mutAI*, *mutAII*, *mutAIII* e *mutAIV* em, respectivamente, 29,1%, <10%, 12,7% e 18,7% dos isolados clínicos de *S. mutans*. Ademais, enquanto que no presente estudo metade dos isolados analisados carregaram o gene *mutAII* em seus genomas, nas pesquisas de Qi, Chen e Caufield (2001) e Kreth et al. (2005b) aproximadamente 50% das amostras amplificou o gene *mutAIV*. Segundo Longo, Mattos-Graner e Mayer (2003) e Li, S et al. (2005), as baixas frequências de detecção de alguns desses genes estruturais revelam a existência de uma ampla diversidade genética no *locus* do gene *mutA* ou mesmo sua ausência nas amostras testadas

Conforme antecipado por outros autores (HAMADA; SLADE, 1980; BALAKRISHNAN et al., 2002; KAMIYA et al., 2005a, 2005b; KAMIYA, HÖFLING; GONÇALVES, 2008), a produção de bacteriocinas por *S. mutans* varia amplamente, sendo que praticamente todas as cepas produzem ao menos um tipo de mutacina. Dessa forma, devido ao vasto espectro de detecção dos genes analisados, optou-se por agrupar os genótipos de *S. mutans* em diferentes classes de virulência. Assim, foi possível identificar aqueles com potencial genético para serem colonizadores mais virulentos (Tabelas 3 a 5). A constatação desses genótipos em 48% dos isolados de *S. mutans* analisados pode significar um importante papel biológico das proteínas por eles decodificadas, sobretudo no processo de formação do biofilme dentário. De acordo com Kamiya et al. (2005a), os genótipos de *S. mutans* que produzem um amplo espectro de mutacinas tendem, com o passar do tempo, a se tornar predominante na maioria dos sítios da cavidade bucal.

A contaminação da criança por *S. mutans* ocorre durante seus primeiros anos de vida, por meio do contato com indivíduos infectados (CAUFIELD; WALKER, 1989; CAUFIELD; GRIFFEN, 2000; BERKOWITZ, 2006). A comparação entre as cepas bacterianas adquiridas pela criança e as de seus conviventes tem sido realizada com base nas características fenotípicas, usando métodos como a mutacinotipagem (BERKOWITZ; JORDAN, 1975; ROGERS, 1975, 1981; DAVEY; ROGERS, 1984; BERKOWITZ; JORDAN, 1985; AZEVEDO; ZELANTE, 1994; VAN LOVEREN; BUIJS; TEN CATE, 2000), e nas características genotípicas, investigadas por diversas técnicas, dentre elas a REA (KULKARNI; CHAN; SANDHAM, 1989; LI; CAUFIELD, 1995; REDMO EMANUELSSON; LI; BRATTHALL, 1998; REDMO EMANUELSSON; WANG, 1998; KOZAI et al., 1999; REDMO EMANUELSSON; THORNQVIST, 2000; TEDJOSASONGKO; KOZAI, 2002; KÖHLER et al., 2003), a RFLP (CAUFIELD; WALKER, 1989; NIE; FAN; BIAN, 2002; LINDQUIST; EMILSON, 2004), a MLST (LAPIRATTANAKULL et al., 2008) a ribotipagem (SAARELA et al., 1993; ALALUUSUA et al., 1994, 1996; GRÖNROOS et al., 1998) e a AP-PCR (LI; WANG; CAUFIELD, 2000; MATTOS-GRANER et al., 2001a; SPOLIDORIO et al., 2003; ERSIN et al., 2004; KLEIN et al., 2004; FIGUEIREDO; CRUZ; CAUFIELD, 2005; LI,S et al., 2005; LI,Y et al., 2005; LIU et al., 2007; RUBIRA, 2007; HAMEŞ-KOCABAŞ et al., 2008; ALVES et al., 2009; MITCHELL et al., 2009; CARLETTO-KÖRBER et al., 2010; DOMÉJEAN et al., 2010; BACA et al., 2012; TEANPAISAN et al., 2012; ZHAN et al., 2012).

Uma vez que as mães geralmente estão em contato íntimo e frequente com seus filhos pequenos, sua indicação como importante fonte de transmissão vertical da microbiota cariogênica é bastante realista (LINDQUIST; EMILSON, 2004). Esta afirmação foi confirmada no presente estudo, diante da constatação de que, em todas as famílias, ao menos um dos genótipo de *S. mutans* adquiridos pelas crianças era similar a algum dos abrigados por sua respectiva genitora (RUBIRA, 2007). Assim, presume-se que, especialmente no período compreendido entre os 19 e 31 meses de idade da criança e denominado por Caufield, Cutter e Dasanayake (1993) de “janela de infectividade”, a transferência materna desses microrganismos é difícil de ser evitada.

A possibilidade de contágio que ocorreu entre os pares mãe-filho também foi evidenciada entre as crianças e seus respectivos pais e avós. Esse intenso

compartilhamento de genótipos dentro de cada família tornou difícil a identificação precisa das suas vias de transmissão e, segundo Rubira (2007), indicou a necessidade de uma reavaliação dos modelos preventivos antimicrobianos focalizados apenas na figura materna. Por exemplo, o genótipo A-1 foi compartilhado por todos os membros da família 1 (Tabela 6). Assim, o que se pode afirmar é somente a origem intrafamiliar do genótipo transmitido à criança, pois a mesma pode tê-lo adquirido tanto da mãe, quanto do pai, ou até mesmo da avó.

Nesta pesquisa, o uso do *Odds Ratio* (Tabela 7), como medida de intensidade da associação entre a virulência dos genótipos de *S. mutans* e a sua capacidade de transmissão e estabilidade, foi essencial para definir uma maior chance dos genótipos mais virulentos serem transmitidos dos indivíduos adultos para as crianças e de serem preservados ao longo do tempo. No entanto, a virulência do *S. mutans* não foi associada à similaridade genotípica observada entre os membros familiares, apesar de que em todas as famílias estudadas foi reconhecido o compartilhamento de no mínimo um genótipo de *S. mutans* identificado como mais virulento.

Alguns estudos de mutacinotipagem e de rastreamento dos genes codificadores de mutacinas buscaram demonstrar sua influência na transmissibilidade de *S. mutans* e apresentaram resultados divergentes. Enquanto Grönroos et al. (1998) e Zhan et al. (2012) acreditam que as mutacinas facilitem a transferência de bactérias das mães para seus respectivos filhos, van Loveren, Buijs e ten Cate (2000) afirmam que a produção dessas substâncias antimicrobianas não aumenta a possibilidade de transmissão intrafamiliar.

Ao contrário do observado no presente trabalho, onde os isolados de *S. mutans* portadores dos genes *mutAI* e *mutAIII* foram mais facilmente transmitidos (Tabela 8), Li, S et al. (2005) detectaram que todos os isolados transmitidos das mães para seus respectivos filhos não carregavam o gene *mutAI*. Todavia, é necessário considerar que a transmissão de *S. mutans* é um processo influenciado não apenas por fatores microbianos, mas também por fatores inerentes ao hospedeiro e ambientais, os quais modulam suas defesas imunológicas e a competitividade bacteriana (SMITH; MATTOS-GRANER, 2008). Além do nível salivar de *S. mutans* (DAVEY; ROGERS, 1984; ALALUUSUA et al., 1996; HAMEŞ-KOCABAŞ et al., 2008), a fidelidade de transmissão também tem sido relacionada

com o tipo de parto (LI, Y et al., 2005) a duração e intensidade da amamentação (LI; WANG; CAUFIELD, 2000) o gênero (LI; CAUFIELD, 1995; REDMO EMANUELSSON; WANG, 1998; LAPIRATTANAKULL et al., 2008) e a raça do hospedeiro (LI; CAUFIELD, 1995).

A colonização do substrato após sua transmissão é fundamental para a sobrevivência das bactérias. Da mesma forma, para ser transmitido e conseguir ocupar seus nichos ecológicos, *S. mutans* necessita persistir na cavidade bucal e se adaptar fisiologicamente a cada fase da colonização (BOWDEN; HAMILTON, 1998). Atualmente, sabe-se que a ocorrência desses eventos envolve possíveis alterações no transcriptoma bacteriano (VIZOTO, 2011), reflexo direto da expressão dos genes. Porém, Li et al. (2001) ressaltam que a adaptação por transformação genética a um ambiente altamente competitivo não ocorre frequentemente; mas, quando a mesma ocorre, pode ser altamente vantajosa para o microrganismo pela aquisição de um gene de resistência a antibiótico ou fator de virulência.

Do ponto de vista ecológico, a cavidade bucal é um sistema de crescimento aberto. Isso significa que nutrientes e microrganismos são repetidamente introduzidos e removidos e, somente se estabelecem aqueles que possuem capacidade de aderência a uma superfície ou que, de alguma outra maneira, fiquem refugiados nos sulcos, fissuras ou espaços interproximais, vencendo as forças de remoção impostas sobretudo pelo fluxo salivar (JORGE, 2007). Nesse sentido, *S. mutans* pode ser beneficiado diante da disponibilidade de mecanismos específicos de adesão, mediados particularmente pela GbpA. Assim, posto que a inativação do gene *gbpA* tende a reduzir a aderência sacarose dependente *in vitro* (RUSSELL; DONALD; DOUGLAS, 1983; MATSUMOTO-NAKANO; FUJITA; OOSHIMA, 2006, 2007) e *in vivo* (MATSUMURA et al., 2003), sua expressiva detecção nos isolados bacterianos analisados poderia explicar a persistência dos genótipos na cavidade bucal dos membros familiares.

Apesar de Hillman, Dzuback e Andrews (1987) e Grönroos et al. (1998) terem avaliado longitudinalmente a colonização de *S. mutans* pelo padrão fenotípico de produção de mutacinas ao longo do tempo, este estudo corrobora os autores ao sugerir que essas proteínas também podem ser consideradas um fator de virulência clinicamente importante para a estabilidade das bactérias no biofilme dentário. Grönroos et al. (1998) destacaram que quando uma criança é exposta à infecção por

uma cepa de *S. mutans* que exibe aumento do nível de produção de mutacinas, pode-se presumir que, sob circunstâncias favoráveis, a mesma vai ser hábil em colonizar o hospedeiro, especialmente se a microbiota bucal ainda não tiver atingido sua estabilidade. Acredita-se que a mutacinogênese influencie a implantação e colonização de *S. mutans* por meio da competição entre as espécies bacterianas, substituindo a microbiota residente ou excluindo bactérias exógenas (HILLMAN; JOHNSON; YAPHE, 1984; KAMYIA; TAIETE; GONÇALVES, 2011; LONGO; MATTOS-GRANER; MAYER, 2003; KURAMITSU et al., 2007). Nesse sentido, há mais de 20 anos, alguns autores (BERKOWITZ; JORDAN, 1975; HILLMAN; JOHNSON; YAPHE, 1984; ALALUUSUA, 1991) já haviam proposto que a propriedade biológica de antagonismo seletivo das mutacinas talvez ajude a explicar por que, uma vez que *S. mutans* se estabeleçam, eles são dificilmente eliminados da microbiota bucal, tornando-se prevalentes na saliva, biofilme e lesões de cárie dentária.

Por se tratar de um estudo genético-molecular, gerou-se uma certa dificuldade para extrapolar alguns dos resultados. De qualquer forma, é possível sugerir um papel individual de cada mutacina na estabilidade do *S. mutans*. Conforme Qi, Chen e Caufield (2001), a mutacina tipo IV parece ser importante na fase inicial da colonização. Sua produção por células planctônicas na saliva deve contribuir para que *S. mutans* elimine os colonizadores primários, visto que seu espectro antimicrobiano é especificamente contra membros do grupo *mitis* de estreptococos bucais, e estabeleça sua própria população. Uma vez colonizada a superfície dentária, *S. mutans* do biofilme produziram as mutacinas tipos I, II e III contra potenciais competidores de diversas espécies bacterianas.

Partindo do princípio de que diferentes cepas de *S. mutans* indicariam mecanismos distintos de virulência e determinados genótipos poderiam colonizar o hospedeiro, induzindo à cárie dentária, melhor do que outros (ALALUUSUA et al., 1991, 1996), o presente trabalho também investigou a influência de alguns fatores de virulência de *S. mutans* sobre o desenvolvimento da doença. Diferentemente de Hazlett, Michalek e Banas (1998), os quais demonstraram maior cariogenicidade, *in vivo*, em mutantes nulos de *gbpA* do que em um tipo selvagem de *S. mutans*, produtor da respectiva proteína, Grönroos et al. (1998) sugeriram um provável aumento do risco à cárie dentária em função da atuação das mutacinas. Inserida

nesse contexto, é que a comprovação da possível relação entre a ocorrência de cárie dentária e a atividade mutacinolítica ou a presença dos genes codificadores de mutacinas permanece sendo o foco principal de diversas pesquisas mundiais.

Kamiya et al. (2005a, 2005b) demonstraram tanto uma maior produção de mutacinas quanto uma maior frequência de detecção do gene *mutAIV* nos isolados de *S. mutans* obtidos dos indivíduos adultos cárie-ativos (68,3%) do que nos livres da doença (31,8%). Esses autores acreditam que *S. mutans* isolados de sujeitos com atividade de cárie dentária foram mais eficientes na colonização da cavidade bucal, no acúmulo bacteriano sobre as superfícies dos dentes e, conseqüentemente, na indução no desenvolvimento da doença. Em contrapartida, Longo, Mattos-Graner e Mayer (2003) não verificaram uma associação entre o espectro inibitório da cepa produtora de mutacina e a incidência de cárie dentária, sugerindo que a produção desse fator de virulência pode não ser relevante para a capacidade da bactéria colonizar o hospedeiro e induzir a doença. Da mesma forma, outros estudos não encontraram diferença no número de isolados clínicos positivos para os genes das mutacinas em crianças (RODRIGUES et al., 2008; BALLINI, 2011) e em indivíduos adultos (VALARINI et al., 2009) com diferentes experiências de cárie dentária.

Em virtude de ter sido utilizada uma subamostra referente a uma população previamente selecionada, não foi possível investigar a associação acima discutida porque todos os isolados analisados foram provenientes de indivíduos adultos cárie-ativos. No entanto, utilizando-se dados clínicos reportados por Rubira (2007), constatou-se não haver diferença entre o número de crianças com e sem cárie dentária colonizadas por genótipos de *S. mutans* mais virulentos (Tabela 8). Assim, a aquisição desses genótipos não influenciou a possibilidade da criança desenvolver a doença, questionando a premissa de que a identificação de genótipos específicos e com potencial de serem colonizadores mais virulentos, poderia prever os indivíduos mais susceptíveis à cárie dentária (NAPIMOGA et al., 2005).

De fato, a ausência de associação entre a experiência de cárie dentária das crianças e a virulência dos genótipos de *S. mutans* transmitidos para as mesmas reforça o caráter multifatorial da doença (KEYES, 1960). Apesar desses microrganismos serem considerados um fator etiológico primário, somente sua presença na saliva ou biofilme dentário do indivíduo não implica a ocorrência de cárie dentária (BRATTHALL, 1992). Fatores secundários, como higiene bucal do

hospedeiro, hábitos alimentares, composição e fluxo salivar, influenciam o metabolismo das bactérias sobre os dentes, modulando a progressão e a severidade da doença (LEITES; PINTO; SOUSA, 2006).

Este trabalho representa uma importante contribuição para o entendimento de como a virulência bacteriana pode atuar no processo de colonização por *S. mutans*, influenciando significativamente sua capacidade de transmissão e estabilidade. Os genótipos familiares mais virulentos tendem a ser transmitidos às crianças e persistirem na cavidade bucal dos indivíduos, sem que isso determine o desfecho final, representado pelo desencadeamento da cárie dentária. No entanto, não se deve descartar a possibilidade de, por meio de medidas educativas e preventivas junto a todos os membros familiares, tentar retardar a contaminação precoce pela microbiota cariogênica, visto que fatores de virulência de *S. mutans* não avaliados podem estar associados com o surgimento da doença.

É importante ainda ressaltar que a expressão de um gene nem sempre acarreta a atividade da proteína decodificada (KAMIYA; HÖFLING; GONÇALVES, 2008). A simples presença dos genes *mutA* no genoma de um isolado de *S. mutans* não pressupõe a ocorrência da síntese proteica. Dessa forma, muitas vezes os resultados relativos à expressão dos genes codificadores das mutacinas não coincidem com o aspecto fenotípico revelado por meio da mutacinotipagem. Em distintas pesquisas, foram observados genótipos idênticos de *S. mutans* apresentando diferentes perfis de produção de mutacinas e vice-versa, indicando que os padrões de espectros inibitórios são independentes do grau de similaridade genética entre as cepas testadas (LONGO; MATTOS-GRANER; MAYER, 2003; KAMIYA et al., 2005a, 2005b; KAMIYA; HÖFLING; GONÇALVES, 2008). De acordo com Kamiya et al. (2005b), um polimorfismo no *locus* gênico pode comprometer o anelamento do *primer* durante a PCR, explicando as situações em que os genótipos de *S. mutans* apresentaram atividade mutacinolítica, mas não amplificaram os genes envolvidos na produção das respectivas mutacinas. Por outro lado, mutações genéticas poderiam alterar ou impedir a atividade de certas mutacinas, justificando o fato de alguns genótipos de *S. mutans* positivos para o gene *mutA* não apresentarem espectro inibitório *in vitro*.

Levando em consideração as informações supracitadas, pretende-se em pesquisas futuras aprimorar o conhecimento acerca dos eventos genéticos

celulares, representados pelas relações entre os ácidos nucleicos e a tradução proteica. Da mesma forma que estudos adicionais ainda são necessários para esclarecer como ocorrem os mecanismos de produção e secreção das mutacinas, esforços também devem ser concentrados para contribuir no entendimento da função biológica e regulação das GBPs. Utilizando-se, por exemplo, a RT-PCR seria possível determinar a expressão dos genes de virulência nos isolados clínicos de *S. mutans* por meio da detecção do RNA mensageiro e consequente síntese da proteína correspondente.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos e de acordo com a metodologia utilizada, pôde-se constatar a existência de uma ampla variabilidade nos determinantes genéticos relacionados com a expressão de fatores de virulência de *S. mutans*, a qual foi comprovada pelo espectro de detecção dos genes *gbpA*, *mutAI*, *mutAII*, *mutAIII* e *mutAIV* nas amostras estudadas.

Os genótipos de *S. mutans* identificados como mais virulentos corresponderam à aproximadamente metade dos genótipos analisados. Os mesmos apresentaram maior chance de serem transmitidos dos indivíduos adultos às crianças e de persistirem na cavidade bucal do que os menos virulentos.

Em relação às hipóteses testadas:

- Somente houve associação entre a virulência dos isolados de *S. mutans* e sua capacidade de transmissão e estabilidade de colonização, rejeitando-se H_0 para essas variáveis e aceitando-se H_0 para a variável compartilhamento;
- Houve associação entre a prevalência de alguns dos genes de virulência estudados e a transmissibilidade dos genótipos de *S. mutans*, rejeitando-se H_0 para os genes *mutAI* e *mutAIII* e aceitando-se H_0 para os genes *gbpA*, *mutAII* e *mutAIV* e,
- Não houve associação entre a aquisição de genótipos de *S. mutans* mais virulentos e a experiência de cárie dentária da criança, aceitando-se H_0 .

A partir dessas constatações, sugere-se que os genótipos dotados de informação genética para sintetizar GbpA e mutacinas apresentam importante vantagem ecológica no processo de colonização por *S. mutans*, mantendo-se estáveis na microbiota bucal do hospedeiro e favorecendo sua transmissão entre os indivíduos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Ajdić D, McShan WM, McLaughlin RE, Savić G, Chang J, Carson MB, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA 159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(22):14434-9.
- 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;39(6):467-71.
- Alaluusua S, Mättö J, Grönroos L, Innilä 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;41(2):167-73.
- Alaluusua S, Takei T, Ooshima T, Hamada S. Mutacin activity of strains isolated from children with varying levels of mutants streptococci and caries. *Arch Oral Biol*. 1991;36(4):251-5.
- Alaluusua S. Transmission of mutans streptococci. *Proc Finn Dent Soc*. 1991;87(4):443-7.
- Alves AC, Nogueira RD, Stipp RN, Pampolini F, Moraes AB, Gonçalves RB, et al. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. *J Med Microbiol*. 2009;58(4):476-81.
- Asaduzzaman SM, Sonomoto K. Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. *J Biosci Bioeng*. 2009;107(5):475-87.
- Azevedo RVP, Zelante F. Streptococci of the mutans group: confirmation of intrafamilial transmission by mutacin typing. *Braz Dent J*. 1994;5(1):27-34.
- Baca P, Castillo AM, Liébana MJ, Castillo F, Martín-Platero A, Liébana J. Horizontal transmission of *Streptococcus mutans* in schoolchildren. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17(3):495-500.
- Balakrishnan M, Simmonds RS, Kilian M, Tagg JR. Different bacteriocin activities of *Streptococcus mutans* reflect distinct phylogenetic lineages. *J Med Microbiol*. 2002;51(11):941-8.

Ballini MB. Estudo de fatores de virulência de *Streptococcus mutans* e componentes da saliva na susceptibilidade à cárie em crianças [dissertação]. Bragança Paulista (SP): Universidade São Francisco; 2011.

Banas JA, Fountain TL, Mazurkiewicz JE, Sun K, Vickerman MM. *Streptococcus mutans* glucan-binding protein-A affects *Streptococcus gordonii* biofilm architecture. FEMS Microbiol Lett. 2007;267(1):80-8.

Banas JA, Potvin HC, Singh RN. The regulation of *Streptococcus mutans* glucan-binding protein A expression. FEMS Microbiol Lett. 1997;154(2):289-92.

Banas JA, Russell RR, Ferretti JJ. Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt. Infect Immun. 1990;58(3):667-73.

Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14(2):89-99.

Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. Front Biosci. 2004;9:1267-77.

Berkowitz RJ, Jones P. Mouth-to-mouth transmission of the bacterium *Streptococcus mutans* between mother and child. Arch Oral Biol. 1985;30(4):377-9.

Berkowitz RJ, Jordan HV. Similarity of bacteriocins of *Streptococcus mutans* from mother and infant. Arch Oral Biol. 1975;20(11):725-30.

Berkowitz RJ. Mutans streptococci: acquisition and transmission. Pediatr Dent. 2006;28(2):106-9.

Bowden GH, Hamilton IR. Survival of oral bacteria. Crit Rev Oral Biol Med. 1998;9(1):54-85.

Bratthall D. Caries, views and perspectives. Scand J Dent Res. 1992;100(1):47-51.

Caris AR, Bremenkamp RM, Martins CAP, Jorge AOC, Koga-Ito CY. Avaliação do meio seletivo SB20 no isolamento de Estreptococos do grupo mutans da saliva. Rev Odontol Univ Cid São Paulo. 2005;17(3):249-55.

Carletto-Körber FPM, González-Iltig RE, Jiménez MG, Cornejo LS. Initial acquisition and genetic identity of *Streptococcus mutans* of mother-child pairs. Pediatr Dent. 2010;32(3):205-11.

Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res.* 1993;72(1):37-45.

Caufield PW, Childers NK, Allen DN, Hansen JB. Distinct bacteriocin groups correlate with different groups of *Streptococcus mutans* plasmids. *Infect Immun.* 1985;48(1):51-6.

Caufield PW, Griffen AL. Dental caries: an infectious and transmissible disease. *Pediatr Clin North Am.* 2000;47(5):1001-19.

Caufield PW, Walker TM. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphisms. *J Clin Microbiol.* 1989;27(2):274-8.

Chikindas ML, Novák J, Driessen AJM, Konings WN, Schilling KM, Caufield PW. Mutacin II, a bactericidal lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(12):2656-60.

Darini ALC, Magalhães VD, Crott LSP. Aplicações da ribotipagem na epidemiologia molecular de infecções bacterianas. *Medicina (Ribeirão Preto).* 1998;31(1):73-80.

Darini, ALC. Métodos de tipagem epidemiológica de bactérias. *Rev Bras Patol Clín.* 1994;30(1):14-9.

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.

De Lorenzo JL. Microbiologia para o estudante de odontologia. São Paulo: Ateneu; 2004.

Doméjean S, Zhan L, DenBesten PK, Stamper J, Boyce WT, Featherstone JD. Horizontal transmission of mutans streptococci in children. *J Dent Res.* 2010;89(1):51-5.

Duque C, Stipp RN, Wang B, Smith DJ, Höfling JF, Kuramitsu HK, et al. Downregulation of GbpB, a component of the VicRK regulon, affects biofilm formation and cell surface characteristics of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 2011;79(2):786-96.

Ersin NK, Kocabas EH, Alpoz AR, Uzel A. Transmission of *Streptococcus mutans* in a group of Turkish families. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19(6):408-10.

Estrela C. Metodologia científica: ciência, ensino, pesquisa. 2. ed. São Paulo: Artmed; 2005.

Figueiredo MC, Cruz IC, Caufield PW. A relação transmissibilidade da doença cárie entre mães e seus filhos adotivos. Publ UEPG Ci Biol Saúde. 2005;11(1):15-27.

Fujita K, Matsumoto-Nakano M, Inagaki S, Ooshima T. Biological functions of glucan-binding protein B of *Streptococcus mutans*. Oral Microbiol Immunol. 2007;22(5):289-92.

Giffard PM, Jacques NA. Definition of a fundamental repeating unit in streptococcal glucosyltransferase glucan-binding regions and related sequences. J Dent Res. 1994;73(6):1133-41.

Gold OD, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol. 1973;18(4):1357-64.

Grönroos L, Saarela M, Mättö 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;66(6):2595-600.

Guo LH, Wang HL, Liu XD, Duan J. Identification of protein differences between two clinical isolates of *Streptococcus mutans* by proteomic analysis. Oral Microbiol Immunol. 2008;23(2):105-11.

Haas W, Banas JA. Ligand-binding properties of the carboxyl-terminal repeat domain of *Streptococcus mutans* glucan-binding protein A. J Bacteriol. 2000;182(3):728-33.

Haas W, MacColl R, Banas JA. Circular dichroism analysis of the glucan binding domain of *Streptococcus mutans* glucan binding protein-A. Biochim Biophys Acta. 1998;1384(1):112-20.

Hale JD, Ting YT, Jack RW, Tagg JR, Heng NC. Bacteriocin (mutacin) production by *Streptococcus mutans* genome sequence reference strain UA159: elucidation of the antimicrobial repertoire by genetic dissection. Appl Environ Microbiol. 2005;71(11):7613-7.

Hamada S, Ooshima T. Inhibitory spectrum of a bacteriocinlike substance (mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. J Dent Res. 1975;54(1):140-5.

Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev. 1980;44(2):331-84.

Hameş-Kocabaş EE, Uçar F, Kocataş Ersin N, Uzel A, Alpöz AR. Colonization and vertical transmission of *Streptococcus mutans* in Turkish children. Microbiol Res. 2008;163(2):168-72.

Hazlett KR, Mazurkiewicz JE, Banas JA. Inactivation of the *gbpA* gene of *Streptococcus mutans* alters structural and functional aspects of plaque biofilm which are compensated by recombination of the *gtfB* and *gtfC* genes. Infect Immun. 1999;67(8):3909-14.

Hazlett KR, Michalek SM, Banas JA. Inactivation of the *gbpA* gene of *Streptococcus mutans* increases virulence and promotes in vivo accumulation of recombinations between the glucosyltransferase B and C genes. Infect Immun. 1998;66(5):2180-5.

Heegaard NH, Nilsson S, Guzman NA. Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1998;715(1):29-54.

Hillman JD, Dzuback AL, Andrews SW. Colonization of the human oral cavity by a *Streptococcus mutans* mutant producing increased bacteriocin. J Dent Res. 1987;66(6):1092-4.

Hillman JD, Johnson KP, Yaphe BI. Isolation of a *Streptococcus mutans* strain producing a novel bacteriocin. Infect Immun. 1984;44(1):141-4.

Hirasawa M, Takada K. A new selective medium for *Streptococcus mutans* and the distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* and their serotypes in dental plaque. Caries Res. 2003;37(3):212-7.

Hoshino T, Fujiwara T, Kawabata S. Evolution of cariogenic character in *Streptococcus mutans*: horizontal transmission of glycosyl hydrolase family 70 genes. Sci Rep. 2012;2:518.

Hossain MS, Biswas I. Mutacins from *Streptococcus mutans* UA159 are active against multiple streptococcal species. Appl Environ Microbiol. 2011;77(7):2428-34.

Ito JA, Técnicas espectroscópicas em biofísica. Caderno de Física da UEFS. 2004;3(1):21-9.

Jawetz E, Melnick A, Adelberg EA. Microbiologia médica. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000.

Jorge AOC. Microbiologia bucal. 3. ed. São Paulo: Ed. Santos; 2007.

- Kamiya RU, Höfling JF, Gonçalves RB. Frequency and expression of mutacin biosynthesis genes in isolates of *Streptococcus mutans* with different mutacin-producing phenotypes. J Med Microbiol. 2008;57(5):626-35.
- Kamiya RU, Napimoga MH, Höfling JF, Gonçalves RB. Frequency of four different mutacin genes in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-free and caries-active individuals. J Med Microbiol. 2005a;54(6):599-604.
- Kamiya RU, Napimoga MH, Rosa RT, Höfling JF, Gonçalves RB. Mutacin production in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-affected and caries-free individuals. Oral Microbiol Immunol. 2005b;20(1):20-4.
- Kamiya RU, Taiete T, Gonçalves RB. Mutacins of *Streptococcus mutans*. Braz J Microbiol. 2011;42:1248-58.
- Kelstrup J, Richmond S, West C, Gibbons RJ. Fingerprinting human oral streptococci by bacteriocin production and sensitivity. Arch Oral Biol. 1970;15(12):1109-16.
- Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries: findings and implications. Arch Oral Biol. 1960;1:304-20.
- Klein MI, Flório FM, Pereira AC, Höfling JF, Gonçalves RB. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. J Clin Microbiol. 2004;42(10):4620-6.
- Köhler B, Lundberg AB, Birkhed D, Papapanou PN. Longitudinal study of intrafamilial mutans streptococci ribotypes. Eur J Oral Sci. 2003;111(5):383-9.
- Komiyama EY, Jorge AOC, Martins CAP, Balducci I, Koga-Ito CY. Avaliação do meio LAPTg como alternativa para o isolamento de *Streptococcus* do grupo *mutans* e lactobacilos da saliva. Rev Biociênc. 2003;9(4):59-64.
- 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.
- Kozai K, Wang DS, Sandham HJ, Phillips HI. Changes in strains of mutans streptococci induced by treatment with chlorhexidine varnish. J Dent Res. 1991;70(9):1252-7.

- Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. J Bacteriol. 2005a;187(21):7193-203.
- Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. Co-ordinated bacteriocin production and competence development: a possible mechanism for taking up DNA from neighbouring species. Mol Microbiol. 2005b;57(2):392-404.
- Kreth J, Merritt J, Zhu L, Shi W, Qi F. Cell density- and ComE-dependent expression of a group of mutacin and mutacin-like genes in *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol Lett. 2006;265(1):11-7.
- 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;68(7):1155-61.
- Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W. Interspecies interactions within oral microbial communities. Microbiol Mol Biol Rev. 2007;71(4):653-70.
- Kuramitsu HK. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. Crit Rev Oral Biol Med. 1993;4(2):159-76.
- Lapirattanakul J, Nakano K, Nomura R, Hamada S, Nakagawa I, Ooshima T. Demonstration of mother-to-child transmission of *Streptococcus mutans* using multilocus sequence typing. Caries Res. 2008;42(6):466-74.
- Leites ACBR, Pinto MB, Sousa ER. Aspectos microbiológicos da cárie dental. Salusvita. 2006;25(2):239-52.
- Li Y, Caufield PW. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. J Dent Res. 1995;74(2):681-5.
- 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;34(2):123-32.
- Li YH, Lau PC, Lee JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. J Bacteriol. 2001;183(3):897-908.
- 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;84(9):806-11.

Li S, Liu T, Xiao X, Yang J, Yang D, Zhuang H, et al. Detection of *mutA* genes in transmitted strains and nontransmitted strains of mutans streptococci. *Caries Res.* 2005;39(5):417-21.

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;38(2):95-103.

Liu J, Bian Z, Fan M, He H, Nie M, Fan B, et al. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed PCR in patients undergoing orthodontic treatment. *Caries Res.* 2004;38(6):523-9.

Liu J, Ling JQ, Zhang K, Wu CD. Physiological properties of *Streptococcus mutans* UA159 biofilm-detached cells. *FEMS Microbiol Lett.* 2013;340(1):11-8.

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;52(9):876-81.

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986;50(4):353-80.

Longo PL, Mattos-Graner RO, Mayer MP. Determination of mutacin activity and detection of *mutA* genes in *Streptococcus mutans* genotypes from caries-free and caries-active children. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18(3):144-9.

Lynch DJ, Fountain TL, Mazurkiewicz JE, Banas JA. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;268(2):158-65.

Ma Y, Lassiter MO, Banas JA, Galperín MY, Taylor KG, Doyle RJ. Multiple glucan-binding proteins of *Streptococcus sobrinus*. *J Bacteriol.* 1996;178(6):1572-7.

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(3):190-212.

Maiden MCJ. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2006;60:561-88.

Matsumoto-Nakano M, Fujita K, Ooshima T. Binding of glucan-binding protein C to GTFD-synthesized soluble glucan in sucrose-dependent adhesion of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21(1):42-6.

Matsumoto-Nakano M, Fujita K, Ooshima T. Comparison of glucan-binding proteins in cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Oral Microbiol Immunol. 2007;22(1):30-5.

Matsumura M, Izumi T, Matsumoto-Nakano M, Tsuji M, Fujiwara T, Ooshima T. The role of glucan-binding proteins in the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Immunol. 2003;47(3):213-5.

Mattos-Graner RO, Jin S, King WF, Chen T, Smith DJ, Duncan MJ. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. Infect Immun. 2001b;69(11):6931-41.

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. 2001a;39(6):2313-6.

Mattos-Graner RO, Porter KA, Smith DJ, Hosogi Y, Duncan MJ. Functional analysis of glucan binding protein B from *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 2006 Jun;188(11):3813-25.

Merritt J, Qi F. The mutacins of *Streptococcus mutans*: regulation and ecology. Mol Oral Microbiol. 2012;27(2):57-69.

Mitchell SC, Ruby JD, Moser S, Momeni S, Smith A, Osgood R, et al. Maternal transmission of mutans streptococci in severe-early childhood caries. Pediatr Dent. 2009;31(3):193-201.

Napimoga MH, Höfling JF, Klein MI, Kamiya RU, Gonçalves RB. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. J Oral Sci. 2005;47(2):59-64.

Napimoga MH, Kamiya RU, Rosa RT, Rosa EA, Höfling JF, Mattos-Graner R, et al. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. J Med Microbiol. 2004;53(7):697-703.

Nava MJA, Silveira MM, Santos SF, Zeni M. Polímeros não-iônicos como agentes precipitantes em processos de concentração de enzimas pectinolíticas. Revista Iberoamericana de Polímeros. 2005;6(2):111-9.

Nes IF, Holo H. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. Biopolymers. 2000;55(1):50-61.

- Nguyen T, Zhang Z, Huang IH, Wu C, Merritt J, Shi W, et al. Genes involved in the repression of mutacin I production in *Streptococcus mutans*. Microbiology. 2009;155(2):551-6.
- Nicolas GG, Lavoie MC, LaPointe. Molecular genetics, genomics and biochemistry of mutacins. Genes, Genomes and Genomics. 2007;1(2):193-208.
- Nie M, Fan M, Bian Z. Transmission of mutans streptococci in adults within a Chinese population. Caries Res. 2002;36(3):161-6.
- Novák J, Caufield PW, Miller EJ. Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 1994;176(14):4316-20.
- Parrot M, Caufield PW, Lavoie MC. Preliminary characterization of four bacteriocins from *Streptococcus mutans*. Can J Microbiol. 1990;36(2):123-30.
- Qi F, Chen P, Caufield PW. Purification and biochemical characterization of mutacin I from the group I strain of *Streptococcus mutans*, CH43, and genetic analysis of mutacin I biosynthesis genes. Appl Environ Microbiol. 2000;66(8):3221-9.
- Qi F, Chen P, Caufield PW. Purification of mutacin III from group III *Streptococcus mutans* UA787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes. Appl Environ Microbiol. 1999;65(9):3880-7.
- Qi F, Chen P, Caufield PW. The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and a nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV. Appl Environ Microbiol. 2001;67(1):15-21.
- 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;18(1):24-9.
- Redmo Emanuelsson IM, 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;13(5):271-7.
- Redmo Emanuelsson IM, Thornqvist E. Genotypes of mutans streptococci tend to persist in their host for several years. Caries Res. 2000;34(2):133-9.

- Redmo Emanuelsson IM, Wang XM. Demonstration of identical strains of mutans streptococci within Chinese families by genotyping. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(3):788-94.
- Rodrigues MR, Maciel SM, Ferreira FBA, Piovezan A, Pieralisi FJS, Poli-Frederico RC. Análise do sorotipo e dos genes para mutacinas em *Streptococcus mutans* isolados de pré-escolares com diferentes experiências de cárie. *Cienc Odontol Bras.* 2008;11(4):40-6.
- Rogers AH, van der Hoeven JS, Mikx FH. Effect of bacteriocin production by *Streptococcus mutans* on the plaque of gnotobiotic rats. *Infect Immun.* 1979;23(3):571-6.
- Rogers AH. Bacteriocin types of *Streptococcus mutans* in human mouths. *Arch Oral Biol.* 1975;20(12):853-8.
- Rogers AH. The source of infection in the intrafamilial transfer of *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 1981;15(1):26-31.
- Rubira CMF. Estudo longitudinal sobre similaridade, transmissão, e estabilidade de colonização de *Streptococcus mutans* em famílias brasileiras [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2007.
- Russell RR, Donald AC, Douglas CW. Fructosyltransferase activity of a glucan-binding protein from *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol.* 1983;129(10):3243-50.
- Russell RR. Glucan-binding proteins of *Streptococcus mutans* serotype c. *J Gen Microbiol.* 1979;112(1):197-201.
- Saarela M, von Troil-Lindén B, Torkko H, Stucki AM, Alaluusua S, Jousimies-Somer H, et al. Transmission of oral bacterial species between spouses. *Oral Microbiol Immunol.* 1993;8(6):349-54.
- Sahl HG, Bierbaum G. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 1998;52:41-79.
- Sahl HG, Jack RW, Bierbaum G. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur J Biochem.* 1995;230(3):827-53.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.

Sato Y, Yamamoto Y, Kizaki H. Cloning and sequence analysis of the *gbpC* gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 1997;65(2):668-75.

Sato Y, Yamamoto Y, Kizaki H. Construction of region-specific partial duplication mutants (merodiploid mutants) to identify the regulatory gene for the glucan-binding protein C gene in vivo in *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol Lett. 2000;186(2):187-91.

Schaechter M, Engleberg CN, Eisenstein BI, Medoff G. Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2002.

Shah DSH, Russell RRB. A novel glucan-binding protein with lipase activity from the oral pathogen *Streptococcus mutans*. Microbiology. 2004;150(6):1947-56.

Smith DJ, Akita H, King WF, Taubman MA. Purification and antigenicity of a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 1994;62(6):2545-52.

Smith DJ, King WF, Godiska R. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to *Streptococcus mutans* glucan binding protein B can confer protection against experimental dental caries. Infect Immun. 2001;69(5):3135-42.

Smith DJ, Mattos-Graner RO. Secretory immunity following mutans streptococcal infection or immunization. Curr Top Microbiol Immunol. 2008;319:131-56.

Smith DJ, Taubman MA. Experimental immunization of rats with a *Streptococcus mutans* 59-kilodalton glucan-binding protein protects against dental caries. Infect Immun. 1996;64(8):3069-73.

Sola MC, Oliveira AP, Feistel JC, Rezende CSM. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. Centro Científico Conhecer. 2012;8(4):1398-418.

Spolidorio DMP, Höfling JF, Pizzolitto AC, Rosa EA, Negrini TC, Spolidorio LC. Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in Brazilian family members. Braz J Microbiol. 2003;34(3):213-7.

Stott DI. Immunoblotting, dot-blotting, and ELISPOT assays: methods and applications. J Immunoassay. 2000;21(2-3):273-96.

Tanzer JM, Börjesson AC, Laskowski L, Kurasz AB, Testa M. Glucose-sucrose-potassium tellurite-bacitracin agar, an alternative to mitis salivarius-bacitracin agar for enumeration of *Streptococcus mutans*. J Clin Microbiol. 1984;20(4):653-9.

Teanpaisan R, Chaethong W, Piwat S, Thitasomakul S. Vertical transmission of mutans streptococci and lactobacillus in Thai families. *Pediatr Dent*. 2012;34(2):24-9.

Tedjosasongko U, Kozai K. Initial acquisition and transmission of mutans streptococci in children at day nursery. *ASDC J Dent Child*. 2002;69(3):284-8.

Tsang P, Merritt J, Nguyen T, Shi W, Qi F. Identification of genes associated with mutacin I production in *Streptococcus mutans* using random insertional mutagenesis. *Microbiology*. 2005;151(12):3947-55.

Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell*. 2008;20(7):1736-7.

Valarini N, Piovezan A, Braga MP, Maciel SM, Ferreira FBA, Poli-Frederico RC. Análise genético-molecular dos genes para sorotipo e mutacina em *Streptococcus mutans* em uma população adulta. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saude*. 2009;11(3):13-6.

Van Loveren C, Buijs JF, ten Cate JM. Similarity of bacteriocin activity profiles of mutans streptococci within the family when the children acquire the strains after the age of 5. *Caries Res*. 2000;34(6):481-5.

Vizoto NL. Influência do regulador CovR na resposta de *Streptococcus mutans* ao contato com saliva e sangue [dissertação]. Piracicaba (SP): Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2011.

Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*. 1969;244(16):4406-12.

Wu CW, Yin LJ, Jiang ST. Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *J Agric Food Chem*. 2004;52(5):1146-51.

Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, Kuramitsu HK. Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect Immun*. 1993;61(9):3811-7.

Zhan L, Tan S, Den Besten P, Featherstone JD, Hoover CI. Factors related to maternal transmission of mutans streptococci in high-risk children- pilot study. *Pediatr Dent*. 2012;34(4):86-91.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Protocolo de preparo do ágar MSBS

Cálculos para 40 placas de Petri - 90x15 mm

Quantidade do meio de cultura:

1 placa	20 mL de meio
40 placas	X
X=800 mL de meio	

Componentes do meio de cultura:

Ágar Mitis Salivarius

90 g de ágar	1000 mL de meio
X	800 mL de meio
X=72 g de ágar	

Açúcar Refinado (Sacarose)

150 g de açúcar	1000 mL de meio
X	800 mL de meio
X=120 g de açúcar	

Em 90 g do Ágar Mitis Salivarius já existe em sua composição 50 g de sacarose e vou utilizar 72 g desse meio. Então:

90 g de ágar	50 g de sacarose
72 g de ágar	X
X=40 g de sacarose	

Portanto, 40 g de sacarose é o que já tenho em 72 g de Ágar Mitis Salivarius. Dessa forma:

$120\text{ g} - 40\text{ g} = 80\text{ g de açúcar refinado}$

Água destilada: qsp 800 mL de meio.

Solução de Bacitracina: 0,8 mL com concentração final de 0,2 U/mL

APÊNDICE B - Protocolo de preparo do caldo BHI

Cálculo para o preparo de 60 tubos de 13 x 100 mm

Quantidade de caldo:

1 tubo	5 mL de caldo
60 tubos	X
X=300 mL de caldo	

Componentes do caldo:**BHI pó**

36 g de pó	1000 mL de caldo
X	300 mL de caldo
X=10,8 g de pó	

Água destilada: qsp 300 mL de caldo

APÊNDICE C - Protocolo de preparo da solução tampão enzimática (Extração de DNA de bactérias Gram-positivas)

Os cálculos abaixo referem-se ao preparo de 100 mL (0,1 L) de solução

Fórmula: 20 mg/mL lisozima, 20 mM Tris-HCl - pH 8.0, 2 mM EDTA, 1,2% Triton

Componentes da solução:

Lisozima (20mg/mL)

20 mg de lisozima	1 mL de solução
X	100 mL de solução
X=200 mg ou 2 g de lisozima	

Triton (1,2%)

100 mL de Triton	100%
X	1,2%
X=1,2 mL de Triton	

Tris-HCl - pH 8.0 (20 mM) - Peso Molecular: 157,60

Molaridade (M) = $\frac{\text{Peso ou massa (quantidade do soluto em g)}}{\text{Peso molecular (PM) x Volume da Solução em L (V)}}$

$20M = \frac{X}{157,60 \times 0,1}$

$$20M = \frac{X}{157,60 \times 0,1}$$

$$X = 20 \times 10^{-3} \times 15,76$$

$$X = 315,20 \times 10^{-3}$$

$$X = 0,315$$

Peso ou massa (quantidade do soluto)=0,315 g

EDTA (2 mM) - Peso Molecular: 292,24

Molaridade (M) = $\frac{\text{Peso ou massa (quantidade do soluto em g)}}{\text{Peso molecular (PM) x Volume da Solução em L(V)}}$

$2M = \frac{X}{292,24 \times 0,1}$

$$2M = \frac{X}{292,24 \times 0,1}$$

$$X = 2 \times 10^{-3} \times 29,224$$

$$X = 58,448 \times 10^{-3}$$

$$X = 0,058$$

Peso ou massa (quantidade do soluto)=0,058 g

Água destilada: qsp 100 mL de solução

APÊNDICE D – Protocolo de padronização da concentração de DNA

Diluição em água ultrapura das amostras com concentração de DNA acima da estabelecida.

C1=Concentração inicial de DNA da amostra

C2=Concentração final de DNA da amostra

V1=Volume da amostra que preciso utilizar para alcançar a concentração de DNA estabelecida

V2=Volume final de cada amostra diluída

Exemplo de cálculo para se obter 150 µL de volume final (V2) a uma concentração final (C2) de DNA de 15 ng/µL:

C1=45,76 ng/µL

C2=15 ng/µL

V1=X

V2=150 µL

$$\begin{aligned}C1.V1 &= C2.V2 \\45,76.X &= 15.150 \\45,76X &= 2250 \\X &= \underline{49,16 \mu L}\end{aligned}$$

Ou seja, precisarei utilizar 49,16 µL (V1) da amostra para alcançar a concentração de DNA de 15 ng/µL.

Agora preciso saber quanto de água destilada preciso acrescentar para um volume final (V2) de 150 µL de DNA.

$$\begin{aligned}V2 - V1 &= \text{Volume de água ultrapura} \\150 \mu L - 49,16 \mu L &= \underline{100,84 \mu L}\end{aligned}$$

Dessa forma, para se obter 150 µL de DNA a uma concentração final de 15 ng/µL precisarei de:

49,16 µL da amostra + 100,84 µL de água ultrapura

APÊNDICE E - Protocolo das condições das reações de PCR

Reagente	1 Reação
Tampão 10X (Tris-HCl 10 mM; KCl 50 mM pH 8,0)	2,5 µL
MgCl ₂ (1,5 mM)	0,75 µL
dNTPs (0,2 mM)	0,5 µL
<i>Primers Forward e Reverse</i> (0,4 µM)	0,4 µL
<i>Taq</i> DNA polimerase Platinum® (1,25U)	0,25 µL
Água ultrapura	15,6 µL
TOTAL <i>MIX</i> DE REAGENTES	20 µL

Em cada reação (25 µL)=20 µL do *mix* de reagentes + 5 µL da amostra de DNA

APÊNDICE F - Protocolo de preparo do gel de agaroseGel de agarose 0,75%

Reagentes	Cuba de Eletroforese Grande (100 mL de gel)	Cuba de Eletroforese Pequena (50 mL de gel)
Agarose	0,75 g	0,375 g
Tampão TBE 1X	100 mL	50 mL
Corante Sybr Safe®	5,0 µL	2,5 µL

Gel de agarose 1,5%

Reagentes	Cuba de Eletroforese Grande (100 mL de gel)	Cuba de Eletroforese Pequena (50 mL de gel)
Agarose	1,5 g	0,75 g
Tampão TBE 1X	100 mL	50 mL
Corante Sybr Safe®	5,0 µL	2,5 µL

ANEXOS

ANEXO A - Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOB/USP

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)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 073/2011

Bauru, 30 de junho de 2011.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **"Fatores de virulência de Streptococcus mutans e sua relação com a persistência e transmissão de genótipos entre membros de famílias brasileiras"**, de autoria de Ana Lídia Soares Cota, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e apreciado em reunião realizada no dia 29 de junho de 2011.

O CEP-FOB/USP considerou o projeto APROVADO lembrando que a condição de aprovação da pesquisa propriamente dita exige o que segue:

- que sejam encaminhados ao CEP-FOB/USP relatórios anuais sobre o andamento da pesquisa (parciais e finais), conforme o cronograma apresentado;
- que sejam notificados ao CEP-FOB/USP, com a devida justificativa, qualquer modificação na metodologia e/ou título e a inclusão ou exclusão de autores;
- na apresentação do relatório final, incluir todos os TCLEs e/ou termos de doação de dentes devidamente assinados e rubricados.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Profª Drª Salete Moura Bonifácio da Silva

Docente do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva

ANEXO B - Autorização para realização da pesquisa nas dependências do Centro Integrado de Pesquisas e do Laboratório de Farmacologia da FOB/USP

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)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Bauru, 01 de junho de 2011.

Senhor Coordenador,

Encaminhamos ao Comitê de Ética em Pesquisa o Projeto de Pesquisa **“FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Streptococcus mutans* E SUA RELAÇÃO COM A PERSISTÊNCIA E TRANSMISSÃO DE GENÓTIPOS ENTRE MEMBROS DE FAMÍLIAS BRASILEIRAS”** de autoria de Ana Lídia Soares Cota sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Salete Moura Bonifácio da Silva para ser avaliado do ponto de vista ético.

Como parte da documentação solicitada por este Colegiado para a avaliação de projetos de pesquisas envolvendo seres humanos, declaramos estar cientes da realização da referida pesquisa nas dependências do Departamento de Ciências Biológicas (disciplina de Farmacologia) e no Centro Integrado de Pesquisas (CIP), desta faculdade.

Informamos que o trabalho só poderá ser iniciado em nossas instalações, após aprovação de um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Salete Moura Bonifácio da Silva
Orientadora

Prof. Dr. Antônio de Castro Rodrigues
Chefe do Departamento de Ciências Biológicas
da FOB/USP

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Responsável pela Área Departamental de
Farmacologia da FOB/USP

Prof. Dr. Vinicius Carvalho Porto
Coordenador do CIP da FOB/USP

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - FOB/USP

ANEXO C - Modelos da transmissão intrafamiliar dos genótipos de *S. mutans*

Fonte: Rubira (2007)