

MARCELO HENRIQUE NAPIMOGA

Cirurgião Dentista

**“AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE CLONALIDADE E VIRULÊNCIA DE
S. mutans ISOLADOS DE INDIVÍDUOS LIVRES DE CÁRIE E
CÁRIE-ATIVOS”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de MESTRE em Odontologia, Área de Cariologia.

Piracicaba, SP

2004

MARCELO HENRIQUE NAPIMOGA

Cirurgião Dentista

**“AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE CLONALIDADE E VIRULÊNCIA DE
S. mutans ISOLADOS DE INDIVÍDUOS LIVRES DE CÁRIE E
CÁRIE-ATIVOS”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de MESTRE em Odontologia, Área de Cariologia.

Orientador

Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Banca Examinadora

Dr. José Francisco Höfling

Dra. Izabel Yoko Ito

Dr. Francisco Carlos Groppo

Piracicaba, SP

2004

Ficha Catalográfica

N162a Napimoga, Marcelo Henrique.
Avaliação do padrão de clonalidade e virulência de *S. mutans* isolados de indivíduos livres de cárie e cárie-ativos. / Marcelo Henrique Napimoga. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.
ix, 62f. : il.

Orientadores : Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves,
Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Streptococcus mutans*. 2. Cáries dentárias. 3.
Genótipo. 4. Polissacarídeos. I. Gonçalves, Reginaldo Bruno.
II. Groppo, Francisco Carlos. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV.
Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

Dedicatória

A Deus,

Por sempre iluminar meu caminho e me conceder força para continuar sempre lutando em busca das conquistas de minha vida

Aos meus pais,

Nestor Napimoga (in memoriam) que sempre esteve presente em minha vida, que foi, e sempre será um exemplo de trabalhador e amigo;

Ivone Ravagnani Napimoga, que batalhou sua vida inteira para que eu pudesse estar concretizando meus sonhos e minhas conquistas;

A minha irmã Camila Napimoga, pela paciência, colaboração e compreensão;

Ao meu amor Juliana Trindade Clemente, que me mostrou o verdadeiro sentimento de amor e cumplicidade e que sempre me incentivou a seguir em frente atrás de realizar meus sonhos.

Com muito carinho,

Dedico.

Agradecimento especial

Ao meu orientador Prof. Dr. **Reginaldo Bruno Gonçalves**,

Pela confiança e credibilidade,

pela contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional

além da grande amizade construída.

Ao Prof. Dr. **José Francisco Höfling**,

Pelo incentivo e por me mostrar como seguir o caminho do ensinamento

A Prof. Dra. **Renata de Oliveira Mattos-Graner**

Pela grande ajuda prestada no decorrer do desenvolvimento deste trabalho

além da confiança e amizade em mim depositada

Obrigado

Meus sinceros agradecimentos,

Aos Profs. Dr. **Pedro Luis Rosalen**, do Laboratório de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica Medicamentosa, Dr. **Sérgio Peres Line**, do Laboratório de Morfologia e Dr. **Jacks Jorge Júnior**, do Laboratório de Patologia que gentilmente permitiram o uso dos seus Laboratórios e equipamentos,

Aos Profs. Dra. **Izabel Yoko Ito** e Dr. **Francisco Carlos Groppo** pela colaboração e análise deste trabalho na apresentação do trabalho de mestrado,

Aos Profs. Dr. **Sérgio R. P. Line**, Dra. **Renata O. Mattos-Graner** e Dra. **Cíntia P. M. Tabchoury** pelas análises críticas de extrema importância na qualificação desta dissertação,

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de Estudo concedida (#01/11787-4),

Ao Prof. Dr. **Lourenço Correr Sobrinho**, coordenador dos cursos de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP e a Prof. Dra. **Maria Cristina Volpato**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia,

Aos amigos e companheiros de pesquisa **Rosimeire Takaki Rosa**, **Regianne Umeko Kamiya** e **Rafael Nóbrega Stipp**, pela ajuda na realização da fase experimental deste trabalho,

Aos amigos funcionários da Microbiologia e Imunologia, **Anderson** e **Wilma** pela inestimável ajuda,

Aos amigos da Microbiologia **Marlise**, **Ana Claudia**, **Rita**, **Marcelo**, **Janaina**, **Wagner**, **Letícia**, **Daniel**, **Iriana**, **Marcelle**, **Maristela**, **Alessandra**, **Ruchele** e **Priscilla**

Aos amigos da Cariologia e Farmacologia **Carolina Aires**, **Giovana**, **Cecília**, **Ramiro**, **Regiane**, **Marcos**, **Giovana Tofoli**, **Filipe** e **Simone**.

Aos amigos de República **Marcelo**, **João**, **Bruno**, **Gustavo**, **Luis Fernando**, **Tiago**, **Ramiro**, **Alan**, **Ibere** e **Fabio** (*in memoriam*) pela verdadeira amizade e companheirismo.

Epígrafe

“Um discípulo nunca pode imitar os passos de seu guia porque cada um tem a maneira de ver a vida, de conviver com as dificuldades e com as conquistas. Ensinar é mostrar que é possível. Aprender é tornar possível a si mesmo”.

Paulo Coelho

SUMÁRIO

RESUMO	p. 1
ABSTRACT	p. 2
1. INTRODUÇÃO	p. 3
2. REVISÃO DA LITERATURA	p. 5
3. PROPOSIÇÃO	p. 13
4. MATERIAL E MÉTODO	p. 14
5. RESULTADOS	p. 28
6. DISCUSSÃO	p. 47
7. CONCLUSÃO	p. 53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	p. 54

RESUMO

No presente estudo foram avaliadas a diversidade clonal e características de virulência de *Streptococcus mutans* (SM) provenientes de indivíduos livres de cárie e cárie-ativos (CPOD $12,0 \pm 3,07$), além da comparação da eficácia de duas técnicas (MEE e AP-PCR) na genotipagem de SM. Um total de 155 amostras de SM provenientes de indivíduos livres de cárie e 144 de indivíduos cárie-ativos foram previamente isolados e identificados de saliva, placa dental e dorso de língua. Os isolados foram submetidos à técnica de MEE (GOT, LAP, M1P, MPI, NSP, PLP) e AP-PCR (OPA-2 e OPA-13) para estabelecer a diversidade genotípica. Foram mensurados os glucanos insolúveis (GI) utilizando SDS-PAGE, pH final da cultura e a capacidade de adesão ao vidro em presença de sacarose das amostras. Os resultados mostraram um alto índice discriminatório de ambas as técnicas (MEE e AP-PCR) em determinar os genótipos de acordo com o índice de Simpson (0,971 e 0,968 respectivamente). No grupo de indivíduos cárie-ativos o maior número de genótipos encontrados, em ambas as técnicas, diferiu do número de genótipos encontrado no grupo de indivíduos cárie-ativos ($p < 0,01$). O pH final e a capacidade de aderência em superfície de vidro não apresentaram diferenças entre os grupos estudados, entretanto, a intensidade das bandas de GI formadas no grupo de cárie-ativos foi maior que o apresentado pelos livres de cárie ($p < 0,05$). A síntese de GI foi positivamente correlacionada com a habilidade de SM em aderir a superfície de vidro ($p < 0,05$). Nossos dados mostram que indivíduos cárie-ativos albergam um maior número de genótipos de *S. mutans* com alta capacidade de sintetizar GI, quando comparado com genótipos isolados de indivíduos livres de cárie.

ABSTRACT

The present study evaluates the clonal diversity and the virulence traits of *Streptococcus mutans* (SM) in caries-free and caries-active subjects (DMFT 12.0±3.07), and compares two different techniques (MEE and AP-PCR) in typing SM. A total of 155 strains of SM from caries-free and 144 strains of caries-active group were previously isolated and identified from saliva, plaque and tongue surface. The isolates were submitted to MEE (GOT, LAP, M1P, MPI, NSP, PLP) and AP-PCR (OPA-2 and OPA-13) to establish the genotype diversity. Water-insoluble glucan (WIG) using SDS-PAGE, final pH of cultures and the ability of bacterial cells to adhere to a smooth glass in the presence of sucrose were measured. The results showed a high discriminatory index of both techniques used (MEE and AP-PCR) to determine the genotypes according to Simpson's index (0.971 and 0.968 respectively). In caries-free group the number of genotypes detected, in both techniques, were lower than the number of genotypes from caries-active group ($p < 0.01$). Final pH and the percentage of adherence on glass surface did not show difference between two groups, however, the intensities of the WIG bands from caries-active group were higher than caries-free group ($p < 0.05$). The WIG were positively correlated with the ability of SM to adhere to glass surface ($p < 0.05$). Our data show that in caries-active individuals exist a higher number of genotypes of *S. mutans* and that those genotype present a higher ability to synthesize WIG when compared to genotypes isolated from caries-free individuals.

1. INTRODUÇÃO

Os estreptococos do grupo mutans são geralmente considerados os principais agentes etiológicos da cárie dental. Este grupo de microrganismos compreende sete espécies distintas, dentre as quais, o *Streptococcus mutans* e o *Streptococcus sobrinus* são os microrganismos mais comumente relacionados a populações humanas (Hamada & Slade, 1980; Loesche, 1986). O *S. mutans* é amplamente distribuído não apenas em populações de moderada ou alta incidência de cárie (Beighton *et al.* 1987; Zickert *et al.* 1982) como também em populações que não apresentam ou têm baixo índice de cárie (Carlsson *et al.* 1985; Matee *et al.* 1993), o que nos mostra que a simples colonização por estes microrganismos não implica no desenvolvimento da cárie dental (Bratthall, 1992).

Variações nos fatores de virulência de *S. mutans* também podem influenciar o desenvolvimento da cárie dental (Caufield, 1997). Fatores como a acidogenicidade, aciduricidade, e a síntese de glucanos insolúveis (GI) a partir da sacarose através da ação de glicosiltransferases (GTF), estão relacionados à capacidade do *S. mutans* em colonizar as superfícies dentais e a indução de cárie (Smith & Taubman, 1997). Mattos-Graner *et al.* (2000) demonstraram uma correlação positiva entre a síntese de glucanos insolúveis e a capacidade de adesão ao vidro em isolados de *S. mutans* de crianças com cárie ativas, sugerindo haver à presença de genótipos mais virulentos em indivíduos que desenvolvem cárie dental.

Diversos estudos têm demonstrado a existência de diferentes genótipos na cavidade oral, utilizando para tal, diferentes técnicas moleculares como a eletroforese de isoenzimas – MEE (Gilmour *et al.* 1987; Rosa 2001), análise de enzima de restrição – REA (Caufield & Walker, 1989; Saarela *et al.* 1993) e reação da polimerase em cadeia com *primer* arbitrário – AP-PCR (Saarela *et al.* 1996; Li & Caufield, 1998; Matos-Nascimento 2002; Gonçalves *et al.* 2002; Klein 2003, Kamiya 2003).

Segundo Alaluusua *et al.* (1996), a maior diversidade genética de estreptococos grupo mutans observada em crianças com cárie de mamadeira, deve-se às condições propícias do ambiente para o estabelecimento de múltiplos genótipos. Entretanto, contrário a esta posição, Kreulen *et al.* (1997), verificaram que crianças com cárie rampante

apresentavam apenas um clone de *S. mutans* enquanto os respectivos irmãos, sem cárie, apresentavam de 2 a 5 clones, sugerindo que clones específicos de *S. mutans* são selecionados em cavidades orais com cárie instalada.

Com base nos dados da literatura disponível, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a diversidade clonal de isolados de *S. mutans* em indivíduos livres de cárie e cárie-ativos assim como comparar as características de virulência de cada genótipo *in vitro*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

As infecções bacterianas mais comuns da cavidade oral nos seres humanos são a cárie dental e doença periodontal (Loesche, 1986), sendo que a placa dental ou biofilme dental tem sido extensivamente estudado por sua relação com estas infecções (Gibbons & van Houte, 1975). O desenvolvimento do biofilme dental ocorre em duas fases distintas. Durante a primeira fase, proteínas da superfície bacteriana interagem com o hospedeiro ou com produtos bacterianos adsorvidos à superfície dentária. Na segunda fase, um biofilme se forma com bactérias acumuladas pela coagregação com a mesma espécie ou com outras espécies e produção de uma matriz polissacarídica extracelular (Kolenbrander, 2000).

A lesão de cárie é uma manifestação de um processo patológico que ocorre na superfície do dente por meses ou anos. Esta doença é resultado de uma interação entre bactérias presente na cavidade oral, as superfícies dentais e constituintes da dieta, especialmente a sacarose (Bowen, 2002).

Em geral, a aquisição de microrganismos pelo corpo humano é através do contato direto entre um hospedeiro e outro, ou através de objetos inanimados, como chupetas e brinquedos (Madigan, 1997). A saliva é a principal via de transmissão de *S. mutans* (Köhler & Bratthall, 1979), e a mãe, é considerada a mais importante fonte de infecção para as crianças (Li & Caufield, 1995; Mattos-Graner, 2001a; Klein, 2003). Embora outros estudos tenham sugerido haver outras formas de aquisição (Mattos-Graner, 2001b).

Os estreptococos do grupo mutans têm sido encontrado em praticamente todos os indivíduos desde alta, baixa ou muito baixa prevalência de cárie (Carlsson *et al.* 1985). Os sorotipos *c/ e/ f* representativo dos *S. mutans* e *d/g* representativo dos *S. sobrinus* são detectados em humanos com frequência. Alguns trabalhos demonstraram também a presença do sorotipo *a* (*S. cricetus*) e *b* (*S. rattus*) (Loesche, 1986).

Alaluusua & Renkonen (1983) verificaram que crianças finlandesas com níveis detectáveis de *S. mutans* aos 2 anos de idade, apresentaram uma incidência de cárie dental 11 vezes maior do que crianças não colonizadas por este microrganismo após dois anos de acompanhamento. Embora um grande número de trabalhos demonstre uma associação significativa entre a infecção precoce por *S. mutans* e a incidência de cárie dental

(Alaluusua & Renkonen, 1983; Köhler *et al.* 1988; Grindefjord *et al.* 1995), a simples detecção destes microrganismos na saliva ou placa dental não justifica o desenvolvimento de cárie dental, devendo-se levar em consideração, a concepção da natureza multifatorial da cárie dental como doença, a qual esta sujeita às próprias condições sócio-econômicas, culturais e ambientais de uma população (Bratthall, 1992).

Gibbons, em 1984, relatou que o potencial cariogênico dos *S. mutans* é principalmente dependente das suas altas propriedades acidogênicas e da habilidade de se acumular nos dentes, sendo que o acúmulo desses microrganismos nos dentes é devido principalmente à síntese de glucanos extracelulares a partir de sacarose.

Características de virulência dos S. mutans

O termo virulência é descrito como a capacidade do microrganismo de causar doenças em um hospedeiro. A relação entre o hospedeiro e o microrganismo é dinâmica e dependente de características dos microrganismos, hospedeiro e de fatores externos. É através de seus fatores de virulência que um determinado microrganismo entra, coloniza e cresce em um hospedeiro suscetível (Madigan, 1997).

Acidogenicidade e Aciduricidade

A acidogenicidade, capacidade de produção de ácidos, e a aciduricidade, capacidade de metabolização de substratos em meio ácido, foram os primeiros fatores de virulência de microrganismos específicos a serem relacionados à etiologia da cárie dental (Loesche, 1986).

Alguns estudos demonstraram que existe diferença na capacidade de produção de ácidos por diferentes espécies do grupo mutans. Emilson *et al.* (1987) e de Soet *et al.* (1991), observaram que os *S. sobrinus* eram mais acidogênicos do que os *S. mutans* em animais *germ-free*. Köhler *et al.* (1995) observaram diferenças na produção de ácidos entre cepas de *S. mutans* isoladas de humanos. Embora tenham detectado grandes variações na acidogenicidade entre cepas de *S. mutans* isoladas de diferentes indivíduos, os autores não foram capazes de correlacionar o potencial acidogênico com o número de lesões de cárie presentes nos indivíduos colonizados por estes microrganismos.

van Houte *et al.* (1996), avaliaram o pH final no qual diferentes espécies com capacidade acidogênica foram completamente inibidos, utilizando um meio acrescido de 1% de glicose. Neste estudo, amostras de placa dental de superfícies radiculares com lesões de cárie ativas e livres de cárie apresentaram maior proporção de microrganismos que atingiram baixo pH final, sugerindo que a cariogenicidade da placa é dependente do aumento na proporção de organismos acidogênicos e acidúricos.

Polissacarídeos extracelulares

Os *S. mutans* sintetizam polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose, o que permite a estas bactérias se aderirem ao dente. De acordo com Loesche (1986), os glucanos insolúveis (com ligações α -1,3) são de significância patológica na cárie dental de superfície lisa em animais quando uma dieta rica em sacarose é consumida. O autor também relata que quando a sacarose é ingerida em intervalos freqüentes entre as refeições, a queda de pH da placa torna-se mais freqüente, aumentando assim a chance para a desmineralização do esmalte dental.

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

Segundo Hanada & Kuramitsu (1988), três GTFs distintas, secretadas pelo *S. mutans*, estão bem caracterizadas tanto bioquimicamente quanto ao nível molecular: 1) GTFB – codificada pelo gene *gtfB*, que sintetiza glucanos insolúveis em água, tendo ligações glicosídicas principais α -1,3; 2) GTFC – codificada pelo gene *gtfC*, que sintetiza uma mistura de glucanos solúveis e insolúveis, os primeiros apresentando ligações glicosídicas principais α -1,6; e 3) GTFD – codificada pelo gene *gtfD*, que sintetiza basicamente glucanos solúveis. A Tabela 1 mostra as GTFs expressas por cepas de *S. mutans*.

Tabela 1 – Enzimas glicosiltransferases (GTF) expressas por *S. mutans*

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

Yamashita *et al.* (1993) avaliaram a cariogenicidade de cepas de *S. mutans* que não expressavam cada um dos genes *gtf* em ratos com dieta rica em sacarose (56%). As cepas que não expressavam a GTFB, induziram um número de 2 a 5 vezes menor de lesões de cárie e produziram apenas 69% de glucanos insolúveis, quando comparadas com as cepas selvagens. As cepas mutantes que não expressavam GTFC, tiveram uma incidência de cárie de cerca de 1,5 a 4 vezes menor e produziram 84% do glucano insolúvel. Já as cepas que não expressavam ambas as GTFB e C praticamente não produziram glucano insolúvel e mostrou uma incidência de cárie de 2 a 5 vezes menor. Tsumori & Kuramitsu (1997), demonstraram que cepas *in vitro* defectivas de um ou mais genes *gtf*, têm sua capacidade de aderência reduzida.

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

Mattos-Graner *et al.* (2000), avaliaram algumas características fenotípicas de virulência de *S. mutans* isolados de crianças com e sem cárie, e observaram uma relação positiva entre a produção de glucanos insolúveis e capacidade de adesão ao vidro,

sugerindo que cepas de crianças com alta atividade de cárie podem colonizar melhor induzindo a cárie dental.

Técnicas Moleculares

Multilocus Enzyme Electrophoresis (MEE)

A técnica de eletroforese de isoenzimas (ou eletroforese de enzimas codificadas por multilocus – MEE) tem se destacado pela habilidade em identificar e quantificar polimorfismo entre indivíduos de uma mesma espécie ou população, com grande capacidade discriminatória e reduzido custo operacional (Selander *et al.*, 1986).

Segundo Dixon & Webb (1979), isoenzimas são múltiplas formas de uma enzima ocorrendo numa única espécie. Isso decorre da presença de vários *loci*, codificando diferentes versões de uma enzima, ou da existência de múltiplos alelos num único *locus* (Harris, 1975), e nesse último caso, cada enzima recebe a denominação aloenzima ou alozima (Prakash *et al.*, 1969). Ao se estudar a expressão e atividade enzimática, pode-se avaliar parâmetros como variação nas massas moleculares e cargas iônicas das isoenzimas, que conferem características polimórficas entre dois ou mais alelos e mesmo entre genes distantes, que codifiquem diferentes formas moleculares da mesma enzima. As isoenzimas podem ser detectadas através de eletroforese em gel. Em Odontologia, Gilmour *et al.* (1987) agrupou as diferentes espécies de estreptococos orais em função de suas relações genéticas, demonstrando a capacidade da técnica em separar espécies. Brown & Patterson (1972) já haviam demonstrado que algumas isoenzimas, como a manitol 1-fosfato desidrogenase, podem ser empregadas na caracterização de linhagens de *S. mutans*, em virtude das variantes genéticas dessa enzima.

A MEE foi aplicada com sucesso no estudo de diversos microrganismos (Selander & Levin, 1980; Selander *et al.*, 1985; Musser *et al.*, 1986; Gilmour *et al.*, 1987; Rosa *et al.*, 2000; Mata *et al.*, 2000). Rosa *et al.* (2002) utilizou amostras de *S. mutans* de voluntários livres de cárie empregando a técnica de MEE, detectando a presença de múltiplos clones na cavidade oral destes voluntários.

Os dados obtidos na MEE podem ser utilizados para correlacionar geneticamente diferentes amostras de uma mesma espécie. De acordo com os dados obtidos com a

mobilidade relativa das enzimas estudadas, podem ser obtidas matrizes de dados binários que posteriormente irão gerar um dendrograma mostrando a distâncias genéticas entre as amostras (Boerlin, 1997).

AP-PCR

Dentre as diferentes aplicações da PCR, a técnica de AP-PCR (Reação da Polimerase em Cadeia com *Primers* Arbitrários) é um método amplamente empregado em estudos sistemáticos e epidemiológicos. Nessa técnica, somente um único *primer* é empregado, de forma arbitrária, enquanto na técnica de PCR clássica, dois *primers* que codificam uma seqüência alvo conhecida, são empregados (Welsh & McClelland, 1990). O aparecimento de bandas eletroforéticas permite a observação da natureza molecular do polimorfismo genético pesquisado. Williams *et al.* (1990) relatam que evidências experimentais, têm mostrado que a diferença de apenas um par de bases (mutações pontuais) são suficientes para causar a não-complementariedade do *primer* com a fita *template*, o que impede a amplificação do segmento. Outras fontes do polimorfismo podem incluir deleções ou inserções nos sítios de ligação do *primer*, que aumentam as distâncias a serem percorridas pela *Taq* polimerase. Desta forma, o polimorfismo genético detectado através dos marcadores RAPD (Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso) tem uma natureza binária, podendo, o segmento amplificado estar presente ou ausente.

A vantagem do AP-PCR consiste na sua habilidade de proporcionar perfis de DNA altamente específicos sem nenhum conhecimento prévio da seqüência do material genético. Esse método utiliza um *primer* com uma seqüência de 10 a 20 bases em média que se ligam a sítios alvos de DNA inespecíficos sob condições que permitam o pareamento de bases. As regiões de DNA unidas aos *primers* são subsequente amplificados pela reação de cadeia de polimerase (PCR) e usado como marcadores polimórficos.

Saarela *et al.* (1996) propuseram o emprego da técnica de AP-PCR na genotipagem de diferentes espécies e sorotipos de estreptococos orais mediante o emprego de determinados *primers*, por eles selecionados. Esses autores observaram, ainda, que os resultados da AP-PCR repetiam-se quando os mesmos isolados eram submetidos a ribotipagem, e que o poder discriminatório dessas duas técnicas era superior à simples sorotipagem, gerando um maior

número de biotipos. A aplicação da técnica de AP-PCR em estudos de clonalidade individual ou familiar envolvendo estreptococos orais foi proposta por Li & Caufield em 1998, que após um prévio *screening* com vários *primers*, mostraram que esse recurso pode ser de grande valia em levantamentos onde são obtidos mais de um clone bacteriano por indivíduo.

Em estudo recente, Gronröos & Alaluusua (2000), utilizando a técnica de AP-PCR, identificaram de 1 a 4 diferentes clones de *Streptococcus mutans* em crianças de 3 a 7 anos, além de constatarem que os diferentes clones foram encontrados em diferentes sítios, sugerindo que os mesmos colonizem sítios específicos.

Redmo-Emanuelsson *et al.* (2003), investigaram a presença de diferentes genótipos e a estabilidade de *S. mutans*, em diferentes sítios da cavidade oral de um mesmo indivíduo utilizando a técnica de AP-PCR. Foram encontrados até sete diferentes clones considerando toda a cavidade oral. Os autores encontraram até quatro diferentes clones em um mesmo sítio, e estes mesmos genótipos foram encontrados em uma segunda avaliação realizada de 4 a 7 meses após a coleta inicial, indicando que este(s) genótipo(s) estava(m) estável(is).

Análises de múltiplos isolados bacterianos por métodos genotípicos, podem ser utilizados para identificar características particulares de um determinado clone. Com a realização de estudos de genotipagem, foi possível demonstrar o aparecimento de cepas de *Cândida albicans* resistentes ao fluconazole em pacientes portadores do vírus HIV (Venkateswarlu *et al.*, 1995), assim como o aparecimento de clones mais virulentos de *Cryptococcus neoformans* (Brandt *et al.*, 1995) e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Mayer *et al.*, 1999).

Diversos trabalhos comparando as técnicas de MEE e AP-PCR foram realizados com as mais diferentes espécies bacterianas como *Candida albicans* (Pujol *et al.*, 1997), *Neisseria meningitidis* (Maiden *et al.*, 1998), *Escherichia coli* (Wang *et al.*, 1993), sendo que estas técnicas têm mostrado bons resultados de correlação entre si (Tybayrenc *et al.* 1993; Wang *et al.* 1993; Brandt *et al.* 1995; Pujol *et al.* 1997). O método de AP-PCR, no qual uma porção do DNA é amplificada por uma curta seqüência de bases, tem sido amplamente utilizado por ser uma técnica que consome pouco tempo de execução quando comparado ao MEE. Entretanto, trabalhos demonstram que o AP-PCR apresenta problemas em relação à reprodutibilidade entre laboratórios (Penner *et al.*, 1993; MacPherson *et al.*, 1993). O MEE é uma técnica que consome

maior tempo para sua realização, porém é a técnica mais indicada para análise de distância genética entre diferentes cepas por causa da análise da diferença entre diferente locus (Pujol *et al.*, 1997) além de apresentar boa reprodutibilidade entre laboratórios (Boerlin, 1997).

Assim, estudos que venham a ampliar os conhecimentos sobre a existência de diferentes genótipos de *Streptococcus mutans* na cavidade oral, suas relações entre a virulência e a atividade de carie, com o emprego de técnicas moleculares mais adequadas, permitirá uma maior compreensão do desenvolvimento desta doença.

3. PROPOSIÇÃO

De acordo com a hipótese da existência de genótipos de *Streptococcus mutans* com características distintas de virulência quando da presença ou não de cárie, os objetivos do presente estudo foram avaliar a diversidade clonal de *S. mutans* de indivíduos livres de cárie e cárie-ativos e comparar as características de virulência *in vitro* dos diferentes genótipos, além de comparar a eficácia das duas técnicas empregadas (MEE e AP-PCR) no estudo da diversidade clonal de *S. mutans*.

4. MATERIAL E MÉTODO

Seleção dos Voluntários

Foram selecionados dezesseis voluntários, de ambos os sexos com idade variando entre 18 e 29 anos ($23,5 \pm 3,91$) sendo oito indivíduos livres de cárie e outros oito que apresentavam lesões de cárie ativa e índice CPOD médio de $12,0 (\pm 3,07)$. Não participaram do processo de seleção indivíduos fumantes, ou com algum tipo de distúrbio sistêmico, assim como aqueles que fizeram uso de antibióticos nos últimos quatro meses. Um único examinador previamente calibrado executou o exame de presença e atividade de cárie nos voluntários selecionados.

Exame Clínico

Os voluntários receberam instruções sobre o trabalho a ser realizado e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP (parecer nº 137/01), em seguida foram realizados exames anamnésicos e clínico dos pacientes selecionados. A prevalência de cárie foi mensurada de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde. Os exames, bem como a coleta das amostras, foram realizados na Clínica de Graduação da FOP-UNICAMP.

Coleta das Amostras

Aos voluntários, foi solicitado que dispensassem saliva não estimulada (aproximadamente 1 mL) em tubos previamente esterilizados. Em seguida, com o auxílio de uma cureta periodontal, foram coletadas amostras de placa dental. Nos voluntários livres de cárie amostras de placa foram obtidas, da mesial e distal de diferentes dentes posteriores enquanto em paciente cárie ativos foi realizada uma remoção cuidadosa da placa na lesão de cárie. Para a coleta do dorso da língua foram utilizados *swabs* esterilizados.

As amostras de placa dental e saburra da língua, foram colocadas em tubos e adicionada solução salina (NaCl) 0,9% e, assim como as amostras de saliva, foram submetidas a 30 segundos de agitação em um vórtex de tubos (Phoenix AT 56), visando a

obtenção de uma suspensão uniforme. Em seguida, foram diluídas em série decimais de 10^{-1} a 10^{-3} em solução NaCl a 0,9%.

Para a cultura dos estreptococos do grupo mutans, alíquotas de 5 μ L de cada diluição foram inoculadas em placa de Petri, contendo meio de cultura Mitis Salivarius Agar (Difco) contendo bacitracina (Sigma) (0,2 UI/mL de meio) – MSB (Gold *et al.*, 1973). Após a incubação por 48 horas em atmosfera com pCO₂ de 10%, a 37°C (Coler Parmer[®], USA), foram isoladas de 10 a 15 colônias com morfologia típica deste grupo, de cada um dos três sítios de cada voluntários, totalizando aproximadamente 45 colônias de cada voluntário. Estas colônias foram transferidas, cada uma, para tubos contendo caldo de infusão de cérebro e coração – BHI (Difco) e levadas à estufa por mais 24 horas nas mesmas condições. Após o crescimento das colônias isoladas, estas foram armazenadas em BHI-glicerol a 10% a –20°C.

Identificação das Amostras

Foram isoladas 316 colônias de voluntários livres de cárie e 257 colônias de voluntários cárie-ativos. Estas colônias foram testadas bioquimicamente para a diferenciação das espécies. A pureza dos estoques congelados foi conferida pela análise das culturas em MSB. A produção da enzima catalase também foi analisada em culturas desenvolvidas em MSB, gotejando-se sobre as colônias, peróxido de hidrogênio a 3%. A prova foi considerada positiva quando houve o desprendimento de bolhas (Whittenburry, 1964). A morfologia celular foi examinada com o auxílio do microscópio em esfregaços das culturas corados pelo método de Gram.

Os testes bioquímicos incluíram a capacidade de hidrólise de arginina e de fermentação de diferentes açúcares (manitol, sorbitol, melibiose e rafinose), resistência à bacitracina e produção de peróxido de hidrogênio. Em todos os testes, foram utilizados como controles, cepas padrão de *S. mutans* (ATCC 25175) e *S. sobrinus* (IB 6715). A Figura 1-A ilustra os métodos de identificação. A Tabela 2 ilustra os critérios utilizados para classificação quanto às espécies, descrito no manual de BERGEY (Hardie, 1986).

TABELA 2 – Características fenotípicas de diferentes espécies de estreptococos do grupo mutans

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

(*) Algumas cepas podem dar resultados negativos; (**) algumas cepas podem dar resultado positivo.

Adaptado de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

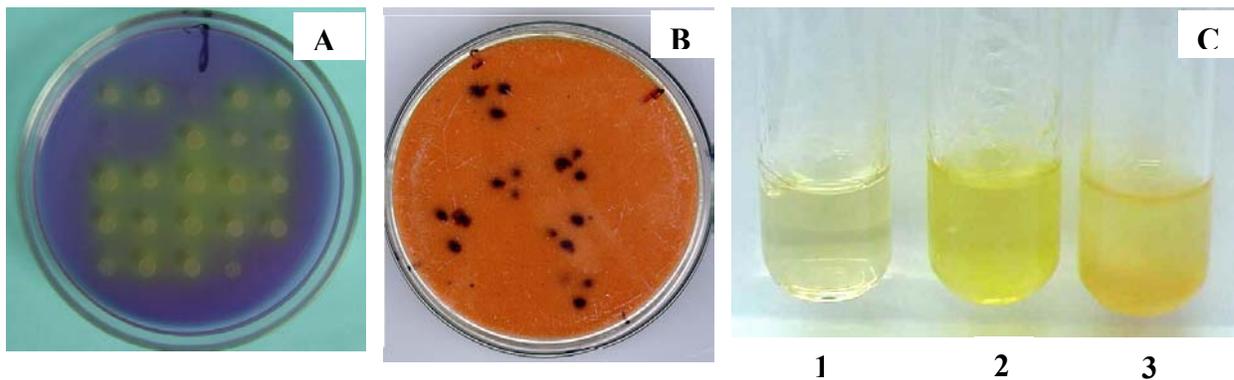


Figura 1 – Testes bioquímicos para determinação das espécies do grupo mutans. A) Fermentação dos açúcares (manitol, sorbitol, melibiose e rafinose) e resistência a bacitracina: Viragem da cor para o amarelo indica resultado positivo; B) Produção de peróxido de hidrogênio: resultados positivos revelados pela mudança de cor para marrom escuro ou preto; C) Teste de hidrólise da arginina: tubos 1, 2 e 3 indicam respectivamente meio de cultura estéril, controle negativo e controle positivo.

Teste de Fermentação de Açúcar

Para esta prova foi utilizado o meio base constituído por tioglicolato sem dextrose (Difco), acrescido de 1,5% de Bacto ágar (Difco) e 0,0016% de púrpura de bromocresol - Inlab (indicador de pH). Após a dissolução dos componentes em água destilada, o pH foi ajustado para 7,0. Após a esterilização do meio a 121°C por 20 minutos, este foi resfriado até aproximadamente 45°C e acrescido da solução de açúcar específica para cada teste: manitol, sorbitol, melibiose ou rafinose (Difco) para uma concentração final de 1,0%, sendo então vertido assepticamente em placas de Petri. As soluções de açúcar utilizadas foram previamente esterilizadas por filtração em membranas de éster de celulose, com porosidade de 0,22 µm (Millipore). Alíquotas das culturas líquidas em caldo BHI, recentes (24 horas), foram inoculadas no meio sólido com o auxílio de replicador de Steer. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ 10% a 37°C e a leitura das placas, realizada após 24 horas de incubação. O teste foi considerado positivo quando se observou viragem do indicador de pH para amarelo e, como negativo, quando não houve esta viragem conforme Shklair & Keene, 1974 (Figura 1-A).

Resistência à Bacitracina

Este teste foi realizado adicionando-se 2UI de bacitracina por mL do mesmo meio utilizado para fermentação de manitol (Shklair & Keene, 1974).

Produção de Peróxido de Hidrogênio

A prova foi realizada em meio base composto de 0,5 g de extrato de carne (Difco); 0,5 g de extrato de levedura (Difco); 0,05 mL de Tween 80 (Synth); 0,01 g de sulfato de manganês (Difco); 1,5 g de agar e água destilada qsp 90 mL. O meio base (pH 7,2) foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e acrescido de 5 mL de solução de sangue desfibrinado de carneiro e água destilada (partes iguais), sendo o meio total aquecido a 100°C por 15 minutos. Adicionaram-se então 5 mL de uma solução de ortodianisidina (Sigma) a 2% em água destilada ao meio de cultura, o qual, em seguida, foi vertido em placas de Petri. Alíquotas das culturas em BHI foram depositadas com o auxílio de uma

agulha de platina em triplicata e as placas incubadas por 72 horas a 37°C em estufa de CO₂. Considerou-se a produção de peróxido de hidrogênio quando da mudança de cor do meio para marrom escuro ou preto, onde houve desenvolvimento bacteriano, demonstrado na Figura 1-B (Whittenburry, 1964).

Hidrólise da Arginina

A prova da hidrólise de arginina se baseia na produção ou não da enzima arginina-desaminase, a qual libera amônia ao reagir com o substrato arginina. A capacidade das amostras hidrolisarem arginina produzindo amônia, foi testada com a semeadura de 0,1 mL do inóculo em tubos contendo o substrato. Após 48 horas de incubação, foram adicionadas duas gotas do Reativo de Nessler a cada tubo. A presença de amônia na cultura, evidenciada pelo aparecimento da coloração alaranjada, indica reação positiva enquanto que a coloração amarela indica prova negativa. A Figura 1-C ilustra o teste realizado.

Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Extração do DNA

As cepas de *S. mutans* conservadas a -20°C, em 10% BHI glicerol, foram reativadas em meio BHI e incubadas a 37°C, por 24 horas, em estufa de CO₂ a 10%. Após o crescimento bacteriano, as células foram centrifugadas, lavadas duas vezes com solução tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) pH 8,0 fervidas por 10 minutos, para o rompimento celular e a extração de DNA (modificado de Saarela *et al.* 1996; Matos-Nascimento 2002; Klein 2003).

O DNA de cada bactéria foi amplificado para a confirmação molecular da identidade do *S. mutans* na presença de um par de *primers* espécie-específicos. Esses *primers* foram desenhados por Oho *et al.* (2000), baseados na seqüência do gene *gtfB*, e amplificam um fragmento de 517-pb. As seqüências são: 5'-ACTACACTTTCGGGTGGCTTGG e 5'-CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC. A amplificação desses fragmentos foi realizada em termociclador (modelo: Gene Amp PCR System 2400 – Applied Biosystems), com mistura de reação (50 µL) contendo 10 mM Tris-

HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dATP, dTTP, dGTP e dCTP, 50 pmol dos *primers*, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase, e 5 μL do DNA bacteriano.

A PCR foi iniciada com a desnaturação inicial das fitas de DNA a 95°C por 3 minutos, seguido de ciclos subseqüentes com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 59°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto. Após 29 ciclos, um ciclo final de 95°C por 30 segundos, 59°C por 30 segundos, e 72°C por 5 minutos determina o final da amplificação (Oho, 2000). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão tris-borato-EDTA (pH 8,0). Foi incluído em cada gel, um padrão de peso molecular de 100 pb. Após o término de cada corrida, o gel foi corado com brometo de etídio 0,5 μg/mL. Quando ocorreu uma única banda de 517-pb, foi confirmada a identidade molecular do *S. mutans*. Foram utilizados como controle positivo *S. mutans* (ATCC 25175) e como controles negativos foram utilizadas cepas de *S. sobrinus* ATCC 6715 e água destilada.

Multilocus Enzyme Electrophoresis (MEE)

As amostras identificadas como sendo *Streptococcus mutans* foram cultivadas a 37°C em microaerofilia por 24 horas, em frascos contendo 400 mL de BHI.

Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas a 4500 rpm por 10 minutos e os sedimentos foram lavados duas vezes com tampão fosfato de potássio 40 mM (pH 7,5), transferidos para tubos de 2 mL com tampa de rosca e os precipitados ressuspensos em aproximadamente 1 mL deste mesmo tampão, aos quais foram adicionadas pérolas de vidro (0,45-0,55 mm) previamente tratadas com ácido clorídrico 1:1, em quantidades iguais a de massa celular (Figura.2). Os tubos foram adaptados em um disruptor de células tipo Bead Beater (Biospec, Inc), onde foram agitados a 4500 rpm por 1 minuto, em 2 tomadas de 30 segundos com intervalo de 5 minutos quando os tubos eram mantidos em gelo (Figura 3).

Após centrifugação de 10000 rpm a 4°C os sobrenadantes com as proteínas citoplasmáticas totais foram aplicadas em tiras de papel de filtro (wicks) Whatman n° 3 (5x12 mm), e mantidos a -70°C até o momento do uso (Figura 4).

A eletroforese foi processada em suporte de amido de milho hidrolisado (Penetrose 30). O amido foi dissolvido até a concentração final de 13%, sob aquecimento em forno de microondas e agitação, em solução tampão do gel específica para as enzimas analisadas, de acordo com Selander *et al.* (1986) e Gilmour *et al.* (1987). Depois de completamente dissolvido o amido, a mistura foi vertida em molde de acrílico de 200x120x10 mm, mantido até resfriamento, quando então, foi feito um corte longitudinal a 25 mm de uma das margens, na sua maior extensão. A menor porção fatiada do gel foi afastada e na fenda formada foram inseridos os *wicks* com as amostras e com marcadores de migração. As duas partes do gel foram novamente unidas e todo o conjunto foi levado ao refrigerador (Figura 5).

Os moldes foram colocados sobre as cubas contendo o sistema de tampões adequados para a enzima estudada (Selander *et al.* 1986), conectada ao gel através da ponte de tecido (Perfex[®]) embebido de tampão. A partir de uma fonte de eletroforese, foi aplicada uma ddp de 130 volts, por 30 minutos. Decorrido esse tempo, a fonte foi desligada e os *wicks* retirados. Os géis foram novamente reunidos e o procedimento eletroforético foi reiniciado, *overnight*, até que o indicador de migração deslocasse aproximadamente 80-100 mm a partir da linha de aplicação, o que pode ser observado, devido a colocação de 2 *wicks* embebidos com solução de azul de bromofenol, em cada uma das duas extremidades da fenda (Figura 6).

Ao término da corrida eletroforética, a fonte foi desligada, o gel foi retirado e fatiado na sua altura, em laminas de aproximadamente 1,5 mm de espessura por intermédio de réguas sobrepostas e de um fio de diâmetro mínimo (linha para pesca nº15). Essas fatias foram removidas para cubas de porcelana de fundo branco e nela foram feitas as revelações das enzimas.

Para a detecção do polimorfismo das amostras, foram empregados os seguintes sistemas-tampão, de acordo com Selander *et al.* (1986): tampão A [Tris-citrato pH 8,0 (cuba) e Tris-citrato pH 8,0 1:30 (gel)] e tampão D [hidróxido de lítio pH 8,1 (cuba) e hidróxido de lítio (1:9) Tris citrato pH 8,3 (gel)], previamente testadas para *S. mutans* (Rosa, 2001).

Análise dos Padrões Eletroforéticos

As imagens positivas dos géis de MEE, foram capturadas por um scanner (Hewlett – Packard modelo ScanJet 4C/T) e transferidas para a interface de análise de géis do programa SigmaGel™ for Windows (Jandel Scientific), onde foram feitas as determinações dos valores de mobilidade relativa (Rm) para cada banda eletroforética, em função da distância de migração do azul de bromofenol.

A análise comparativa dos perfis da MEE dos isolados de cada voluntário, acessada pela soma de todos os sistemas enzimáticos, permitiu observar a ocorrência ou não de um ou mais clones de *S. mutans* na saliva, placa dental e dorso de língua dos diferentes voluntários. Os isolados que apresentaram mesmo tipo eletromórfico (ET) foram considerados como sendo um mesmo clone bacteriano.

Com a finalidade de confirmação matemática, os perfis de todos os isolados foram convertidos em matriz de dados binários, na qual a presença de uma banda num dado Rm recebeu valor 1 e a ausência recebeu valor 0. Essa matriz foi plotada no programa NTSYS versão 1.7 (Applied Biostatistics, Inc) que forneceu, mediante a aplicação do coeficiente de associação Dice, uma matriz de similaridade que após tratamento com o algoritmo UPGMA forneceu um dendrograma de similaridade, com o agrupamento dos possíveis clones formados.



Figura 2 – Tubo de plástico (2mL) empregado na extração de proteínas intracelulares de *S. mutans*



Figura 3 - Disruptor de células BeadBeater



Figura 4 – Wicks embebidos em solução protéica e armazenada a -70°C



Figura 5 - Aplicação dos *wicks* contendo amostras e azul de bromofenol em gel de amido



Figura 6 - Sistema de corrida eletroforética para izoenzimas (gel de amido apoiado sobre as cubas e conectado através de ponte de tecidos)

Reação da Polimerase em Cadeia com *Primer* Arbitrário (AP-PCR)

AP-PCR

A reação de AP-PCR foi processada segundo Saarela *et al.* (1996). Cerca de 350 ng (mensurados a 280 nm em espectrofotometro) de DNA foram adicionados a uma mistura de reagentes contendo solução tampão (1X Reaction Buffer Taq Polymerase, Invitrogen), 3,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP (DNA Polymerization Mix, Invitrogen), 0,4 µM de *primer* OPA-02 ou OPA-13 (Tabela 3), 2,5 U de Taq DNA Polymerase. Em seguida, esta mistura de reagentes foi submetida à amplificação (GeneAmp PCR System 2400) de acordo com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 min, hibridização do *primer* a 36°C por 2 min e extensão a 72°C por 2 min, concluindo com extensão a 72°C for 5 min.

Para testar a reprodutibilidade da AP-PCR, o DNA extraído da cepa padrão *S. mutans* ATCC 25175 foi amplificado, juntamente com os isolados, sendo incorporado em todos os géis de análise.

Tabela 3 - Seqüência dos *Primers* arbitrários

<i>Primer</i>	Seqüência
OPA-02	5'TGCCGAGCTG 3'
OPA-13	5'CAGCACCCAC 3'

Eletroforese

Os produtos resultantes da amplificação por AP-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE - pH 8.0). Estes produtos amplificados foram adicionados ao tampão de corrida, em partes iguais, foram colocados no gel de agarose e submetidos à corrida eletroforética (90 mV, por 2 horas). Em cada gel, foi incluído, um padrão de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder 100 pb, Invitrogen). Após o término de cada corrida, o gel foi corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL (10 min) e as bandas observadas com auxílio de um transluminador de luz ultravioleta.

Análise do Padrão Eletroforético

A documentação fotográfica foi obtida com o sistema Image Master -VDS (Pharmacia Biotec[®]) e a captura das imagens realizada pelo programa computacional LISCAP. As imagens positivas e a demarcação das bandas eletroforéticas de maiores intensidades foram processadas através do programa Sigma Gel (Jandel Co[®]), visualmente, para a obtenção da mobilidade relativa de cada banda (valores de R_m) em função dos valores conhecidos do padrão de massa molecular.

As bandas eletroforéticas representadas pelos valores de R_m tiveram suas distâncias convertidas em valores numéricos (valor um para presença e valor zero para ausência das bandas) e o conjunto de informações ou matriz de dados binários foi submetido ao sistema NTSYS versão 1.7 (Applied Biostatistics), para construção de dendrogramas. Empregou-se o programa QUALITATIVE e o coeficiente de similaridade DICE ao nível de significância de 95%.

Após a construção das matrizes de similaridade, aplicou-se o programa SHAN CLUSTERING, e através do método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Mathematic Average), obteve-se os dendrogramas para as avaliações dos graus de similaridade entre as amostras de *S. mutans* analisadas.

Análise do pH Final

Foram escolhidas duas amostras de cada genótipo, aleatoriamente, para que fossem realizados os testes de virulência. O pH final foi determinado segundo van Houte *et al.* (1996), para as cepas isoladas e identificadas como *Streptococcus mutans* de ambos os grupos. Para este fim, alíquotas dos estoques congelados foram inoculadas em meio BHI e incubados em microaerofilia por 24 horas a 37°C. Após o crescimento bacteriano, a densidade óptica (DO) das suspensões de células foi medida em espectrofotômetro (Genesys 10UV, Spectronic) em comprimento de onda de 600 nm, sendo consideradas ideais para o uso DO ente 0,8 e 1,0. Alíquotas de 100 µL destas culturas foram então inoculadas em tubos com 3 mL de caldo vermelho fenol (Difco) acrescido de 1% de glicose. A seguir, os tubos foram incubados a 37°C nas mesmas condições durante 72 horas. Tubos controles não inoculados também foram incubados em todas as baterias de

culturas. Após a incubação, mediram-se os valores de pH em pHmetro previamente calibrado (Nova Técnica). Os testes foram realizados em triplicata para todas as cepas testadas.

Análise da Produção e Atividade de Glicosiltransferase

As amostras de *S. mutans* previamente escolhidas de ambos os grupos, foram reativadas a partir dos estoques congelados, através de incubação em meio BHI a 37°C em microaerofilia durante 20 horas. De acordo com a DO inicial, as alíquotas foram transferidas para outro tubo contendo 3 mL de BHI por mais 20 horas a fim de obter uma quantidade de células aproximada entre todas cepas. A seguir as culturas foram submetidas à centrifugação a 4°C (10000 rpm) durante 5 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para tubos de ensaio e acrescidos de solução inibidora de protease (Phenylmethysufonyl fluoride, Sigma). O pH das amostras foi neutralizado (7,0) pela adição gradual de NaOH 1 M e as amostras submetidas à diálise em membranas de celulose (com porosidade capaz de reter proteínas acima de 12 kDa; Inlab) à temperatura de 4°C contra 3 L de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,8) durante 20 horas e, a seguir, contra 3 L de tampão Tris-HCl 1,25 mM (pH 6,8) em duas tomadas de 3 horas cada. As amostras foram então congeladas e liofilizadas durante 8 horas e, a seguir, mantidas em freezer -70°C. Para realização da eletroforese, foram acrescidos 30 µL de água destilada e 30 µL de tampão de amostra contendo SDS e β-mercaptoetanol (Bio-Rad) aos sobrenadantes liofilizados, sendo estas aquecidas a uma temperatura de 55°C durante 1 minuto.

Padrão Eletroforético das Proteínas secretadas e expressão de GTF

Quantidades equivalentes de proteínas das amostras concentradas de sobrenadante foram separadas eletroforéticamente sob condições redutoras (Laemmli, 1970) em géis de poliacrilamida-SDS a 6%, realizados em duplicata. Marcadores de peso molecular (Bio-Rad) também foram incluídas em todos os géis.

Após a eletroforese, as bandas protéicas de massa molecular correspondente as GTFs (localizada entre os marcadores de massa molecular de 116 e 205 kDa) foram identificadas através da coloração de um dos géis com solução de *Coomassie Blue* a 0,04%

(Blue R, Serva) durante 3 horas, seguida de lavagem com solução descorante (50% de metanol e 10% de ácido acético) durante 4 horas (Taubman *et al.* 1988).

Atividade enzimática de GTF

A atividade enzimática das bandas de GTF foi analisada no segundo gel de poliacrilamida-SDS a 6% realizados como descrito anteriormente. Após a separação eletroforética os géis foram incubados com tampão de renaturação contendo Triton, pH 6.8 (Bio-Rad) para remover o SDS em seguida, o gel foi incubado a 37°C durante 24 horas, com solução de sacarose (Synth) a 5% e tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 6,5) contendo 0,2% de dextrano T70 (Pharmacia), 1% de Triton X-100 (Pharmacia) e 0,02% de NaN₃ (Merck). A reação foi paralisada através da lavagem do gel com solução de 0,02% de NaN₃ em água destilada a 4°C durante 10 minutos. Detectou-se a produção de glucanos insolúveis em água (GI) pela formação de bandas de coloração brancas na altura da massa molecular correspondentes as GTFs. Os géis foram então fotografados contra uma superfície preta.

Quantificou-se a produção das GTFs através da análise densitométrica (Hazlett *et al.* 1998), sendo os valores de DO obtidos normalizados pelos valores observados para as respectivas bandas de GI. As imagens foram digitalizadas em scanner (GS 700 – Bio Rad) e analisadas pelo programa de computador Molecular Analyst 1.5 (Bio Rad). Para eliminar as diferenças na síntese de GI devido a variações na quantidade de GTF produzida, os valores normalizados das intensidades das bandas de GI foram divididos pelos valores de intensidade das bandas de GTF correspondentes.

Análise de Aderência em Vidro

A habilidade das células bacterianas em aderir às superfícies lisas de vidro na presença de sacarose foi determinada pelo método descrito por Hamada *et al.* (1978). Alíquotas de 100 µL do estoque congelado representativo de cada genótipo foram inoculadas em BHI e incubadas durante 24 horas a 10% de CO₂. Alíquotas de 100µL das amostras que apresentavam DO entre 0,8 e 1,0 a 600 nm, foram transferidas para tubos de ensaio de vidro 12x75 mm (Pirex) contendo 3 mL de BHI suplementado com 1% de sacarose. Os tubos foram incubados a

37°C com uma inclinação de 30 graus durante 18 horas em atmosfera de 10% de CO₂. A seguir, cada tubo foi levemente agitado por 5 segundos em agitador de tubos e, o meio de cultura (contendo as células não aderidas) foi transferido para um segundo tubo. Então, 3 mL de tampão fosfato de potássio (0,05M, pH 7,0) foram adicionados ao tubo, o qual foi novamente agitado por 5 segundos e a solução tampão, contendo as células desprendidas, transferidos para um terceiro tubo. Os tubos de número 2 e 3 foram centrifugados durante 5 minutos a 10000 rpm e os precipitados ressuspensos em 3 mL do mesmo tampão. Todos os tubos (nº 1, 2 e 3) foram submetidos à sonicação durante 30 segundos com amplitude 10 em banho de gelo (Sonic & Materials – Vibra Cell). A seguir, a densidade das suspensões de células foi mensurada, em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550 nm. A proporção de células aderidas foi calculada dividindo-se os valores de absorvância obtido para os tubos de nº 1 pela soma dos valores de absorvância obtidos para todos os tubos (nº 1, 2 e 3), sendo o resultado expresso em porcentagem. Como controle de aderência positivo foi utilizada, a cepa de *S. mutans* ATCC 25175. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5. RESULTADOS

Identificação das cepas de S. mutans.

Foram isoladas 316 cepas de indivíduos livres de cárie e 257 cepas de indivíduos cárie-ativos, destas 254 e 219 cepas, respectivamente, foram identificadas bioquimicamente como *S. mutans*. Dentre todas as amostras de *S. mutans* analisadas, 96,74% das amostras apresentaram resultados idênticos para identificação bioquímica e por PCR, mostrando que ambas as técnicas possuem um alto grau de confiabilidade e especificidade. Amostras que não deram resultados positivos nas duas técnicas foram descartados. Dos isolados inicialmente coletados e identificados como sendo *S. mutans*, um total de 299 cepas (155 provenientes do grupo livre de cárie e 144 proveniente do grupo cárie ativo) foram utilizadas nas análises subseqüentes.

Genotipagem

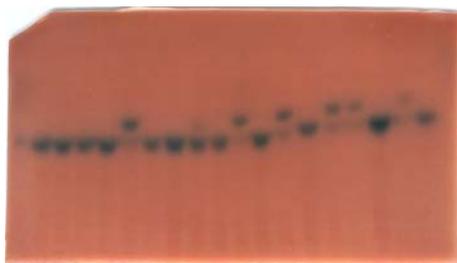
Os sistemas que previamente se mostraram viáveis para detecção de polimorfismo para *S. mutans* de acordo com Rosa (2001) foram: transaminase glutâmico-oxalacético (GOT) – Tampão D; Leucina amino peptidase (LAP) – Tampão A; Manitol 1-fosfato desidrogenase (M1P) – Tampão D; Manose fosfato isomerase (MPI) – Tampão A; Nucleosídeo fosforilase (NSP) – Tampão A; Fenilalanil-leucina peptidase (PLP) – Tampão A. A Figura 7 mostra algumas das diferentes reações enzimáticas testadas. De acordo com os diferentes perfis de bandeamento enzimáticos acessados, pode-se montar uma matriz de dados binários, que posteriormente foram analisados no programa UPGMA o qual converteu estes dados em dendrogramas de similaridade.



Manitol 1-fosfato desidrogenase (MIP)



Manose fosfato isomerase (MPI)



Leucina amino peptidase (LAP)



Fenilalanil-leucina peptidase (PLP)

Figura 7 – Após eletroforese fatias do gel são coradas para as diferentes reações enzimáticas.

A segunda técnica utilizada para analisar a variabilidade genética das cepas de *S. mutans* foi o AP-PCR. A amplificação do DNA genômico desta espécie, foi realizada com dois diferentes *primers* arbitrários, OPA-02 e OPA13 (Figura 8).

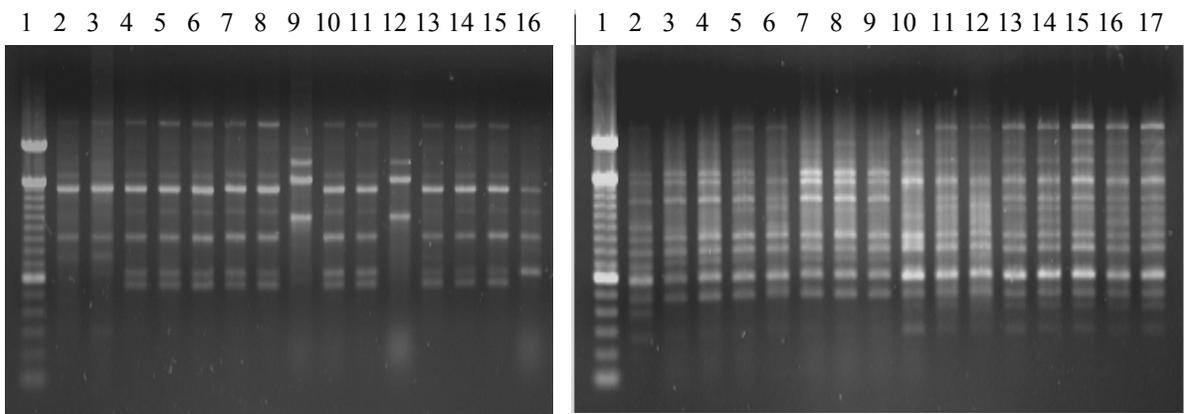


Figura 8 – Gel de AP-PCR realizado com *primer* OPA-13 e OPA-02 respectivamente.

Das 155 cepas analisadas no grupo de indivíduos livres de cárie, o MEE foi capaz de distinguir 27 genótipos distintos (de 2 a 4 genótipos por indivíduo), enquanto o AP-PCR detectou 24 diferentes genótipos (de 1 a 4 genótipos por indivíduo). No grupo de indivíduos cárie-ativos, das 144 cepas avaliadas pelas duas técnicas, foram caracterizados 51 genótipos (de 4 a 11 genótipos por indivíduo) e 44 genótipos (de 2 a 8 genótipos por indivíduo) respectivamente. Para realização do agrupamento genético foram consideradas cepas de mesmo genótipo, aquelas contendo similaridade igual ou superior a 95%. Os resultados de ambas as técnicas para cepas pertencentes ao grupo de indivíduos livres de cárie estão expressos na Tabela 4 e as cepas pertencentes aos voluntários cárie-ativos estão expressos na Tabela 5.

Tabela 4 – Número de genótipos obtidos no grupo de indivíduos livre de cárie

Indivíduo	Isolados (n)	MEE	AP-PCR
A	27	4	4
C	08	4	3
D	25	3	3
E	17	2	3
G	19	4	3
I	18	4	1
O	23	3	4
R	18	4	3
Total	155	27	24

Tabela 5 – Número de genótipos obtidos no grupo de indivíduos cárie-ativos

Indivíduo	Isolados (n)	MEE	AP-PCR
C1	26	5	2
C2	19	11	8
C3	19	7	6
C4	15	6	6
C5	11	5	4
C7	20	8	7
C8	16	5	4
C9	18	4	7
Total	144	51	44

O número de cepas utilizadas de cada indivíduo não demonstrou ser uma variável de influência no número de genótipos identificados, para ambos os grupos foram realizados testes de correlação linear de Pearson, sendo que não foram encontradas correlações estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Não houve diferença estatisticamente significativa com relação ao número de genótipos quando comparadas as técnicas de MEE e AP-PCR em ambos os grupos (qui-quadrado, $p > 0,05$), porém a ocorrência de um número maior de genótipos em indivíduos cárie-ativos foi estatisticamente significativa para ambas as técnicas (Newman – Keuls $p < 0,01$). Os valores estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6 – Número de genótipos encontrados por ambas as técnicas (MEE e AP-PCR) nos grupos de indivíduos livres de cárie e cárie-ativos.

Grupo	Isolados (n)	MEE	AP-PCR
Livres de cárie	155	27 ^a	24 ^a
Cárie-ativos	144	51 ^b	44 ^b

Teste Newman – Keuls $p < 0,01$

Diferentes letras demonstram diferença estatística entre os grupos analisados (livres de cárie e cárie-ativos) em ambas as técnicas.

Para comparar o poder discriminatório de ambas as técnicas, foi utilizado o índice de Simpson proposto por Hunter & Gaston (1988). Para o cálculo do índice proposto foi utilizada a seguinte equação:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j (n_j - 1)$$

N é o número total de amostras

S é o número total de genótipos

n_j é o número de amostras pertencentes ao genótipo.

Esta equação pode ser aplicada para uma comparação direta com relação ao poder discriminatório de técnicas de genotipagem, e para analisar o poder discriminatório de técnicas de genotipagem combinadas (Hunter & Gaston, 1988). A Tabela 7 mostra os valores obtidos por ambas as técnicas. É possível observar que ambas as técnicas demonstraram um alto poder discriminatório para genotipagem de cepas de *S. mutans*.

Tabela 7 - Coeficiente de discriminação de genotipagem das técnicas de MEE e AP-PCR para cepas de *S. mutans*

Técnica	Isolados (n)	Índice discriminatório
MEE	299	0,971
AP-PCR	299	0,968

Seleção de amostras para os testes de virulência

Foram escolhidas, aleatoriamente de 2 a 3 cepas pertencentes ao mesmo genótipo para que fossem realizados os testes de virulência. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa (ANOVA, $p > 0,05$) entre diferentes cepas de mesmo genótipo em nenhuma análise de características de virulência (Tabela 8), sendo que os testes foram realizados em triplicata. Sendo assim, foi escolhida aleatoriamente uma cepa representativa de cada genótipo para realização da análise das características de virulência apresentadas neste trabalho.

Tabela 8: Dados ilustrativos comparativos das características de virulência testadas (pH final, % de células aderidas ao vidro e síntese de glucano insolúvel) entre diferentes amostras pertencentes ao mesmo genótipo. Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhuma das características analisadas entre as amostras.

Amostras	pH final	DP	% adesão ^a	DP	GI ^b	DP
AP35	4,18	0,04	17,59	0,96	62,46	3,43
AD8	4,19	0,03	21,12	0,26	57,49	2,49
GD2	4,13	0,02	21,97	0,17	76,84	2,43
GP8	4,21	0,06	20,77	1,52	68,12	1,37
GS43	4,24	0,08	23,09	0,18	45,60	6,35
GS38	4,18	0,03	26,28	1,31	33,04	1,08
IS1	4,25	0,01	26,65	1,01	29,32	0,78
IP35	4,15	0,05	23,05	0,65	26,51	0,49
RP2	4,21	0,10	37,69	1,59	52,76	4,45
RD6	4,33	0,16	25,93	0,83	45,59	5,03
C1S1	4,18	0,09	22,19	0,54	54,28	3,01
C1S2	4,25	0,03	20,85	0,39	50,43	5,64
C3P5	4,17	0,02	32,44	0,27	82,18	4,00
C3D14	4,19	0,04	20,38	0,31	75,32	3,97
C3S13	4,24	0,08	29,27	0,35	77,10	3,28
C3D10	4,16	0,03	25,69	0,24	64,38	7,86

^a valores de densitometria das bandas de GI observadas nos géis incubados com sacarose 5%

^b valores de absorvância das células aderidas ao vidro dividido pelos valores de absorvância do total de células, expressos em porcentagem.

Valores de pH final

Os valores de pH final entre os genótipos variaram no grupo de indivíduos livres de cárie de 4,08 a 4,66 (Figura 9), enquanto no grupo de indivíduos cárie-ativos os valores variaram de 3,97 a 4,36 (Figura 10). Os valores de pH final quando comparados entre os dois grupos analisados não apresentaram diferença estatisticamente significativa (ANOVA $p > 0,05$), sendo que o valor de pH final do grupo livre de cárie ficou em 4,27 contra um pH final do grupo cárie-ativos de 4,21 (Figura 11). Os valores médios de pH final de ambos os grupos ficaram muito próximos e estão listados na Tabela 9.

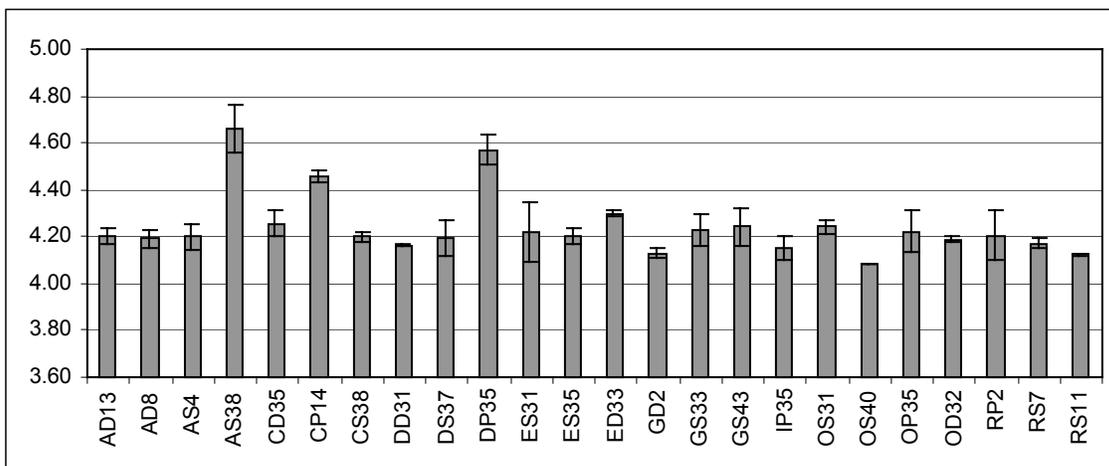


Figura 9: Valores médios (\pm DP) do pH final dos genótipos analisados dos indivíduos livres de cárie. Os valores variaram entre 4,08 a 4,66. As análises foram realizadas em triplicata.

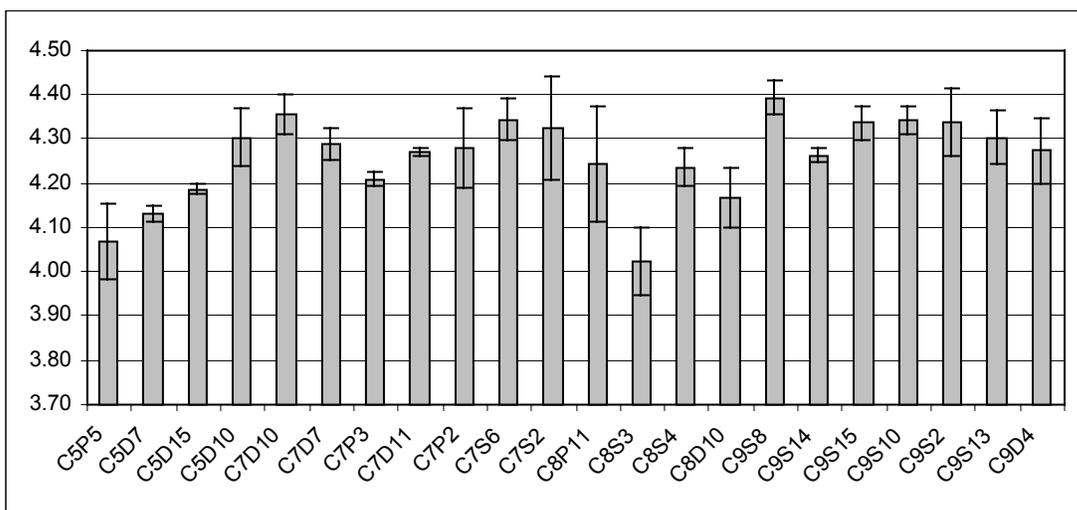
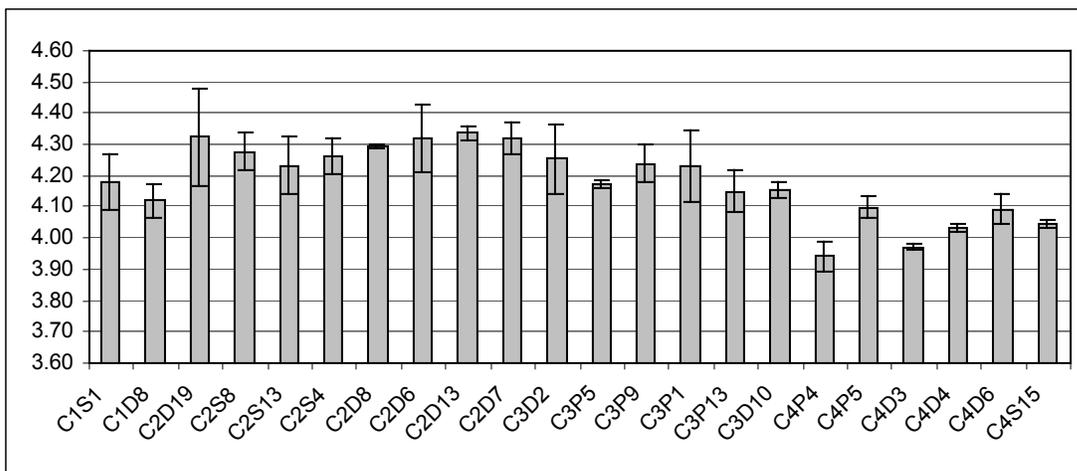


Figura 10: Valores médios (\pm DP) do pH final dos genótipos analisados dos indivíduos cárie-ativos. Os valores variaram entre 3,97 a 4,36. As análises foram realizadas em triplicata

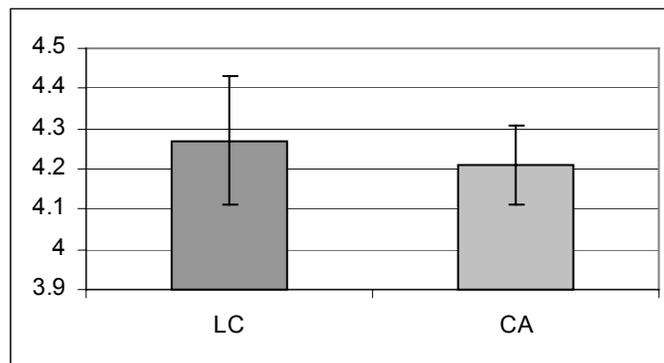


Figura 11 – Valores médios de pH final de *S. mutans* isolados de indivíduos livres de cárie (LC) e indivíduos cárie-ativos (CA). O teste estatístico ANOVA não demonstrou diferença entre os grupos estudados

Capacidade aderência ao vidro na presença de sacarose

Foi encontrada uma grande variação nos valores de adesão ao vidro na presença de sacarose entre os genótipos pertencentes a cada indivíduo. No grupo de indivíduos livres de cárie a porcentagem de aderência variou de 5,11% a 61,06% (Figura 12) enquanto no grupo de indivíduos cárie-ativos a variação ficou entre 3,56% e 71,53% (Figura 13). A média de aderência dos *S. mutans* considerando os grupos não apresentou diferença estatística significativa (ANOVA, $p > 0,05$) sendo os valores médios de 20,02% e 23,68% respectivamente (Figura 14). Os valores médios de capacidade de aderência na presença de sacarose estão expressos na Tabela 9. Encontramos uma correlação positiva estatisticamente significativa entre a síntese de glucanos insolúveis e a porcentagem de células aderidas *in vitro* na presença de sacarose (Spearman: $r = 0,34$; $p = 0,02$) de *S. mutans* isolados de indivíduos cárie-ativos (Figura 15), a qual não foi observada no grupo composto por indivíduos livres de cárie (Spearman: $r = -0,03$; $p = 0,86$) ilustrado na Figura 16.

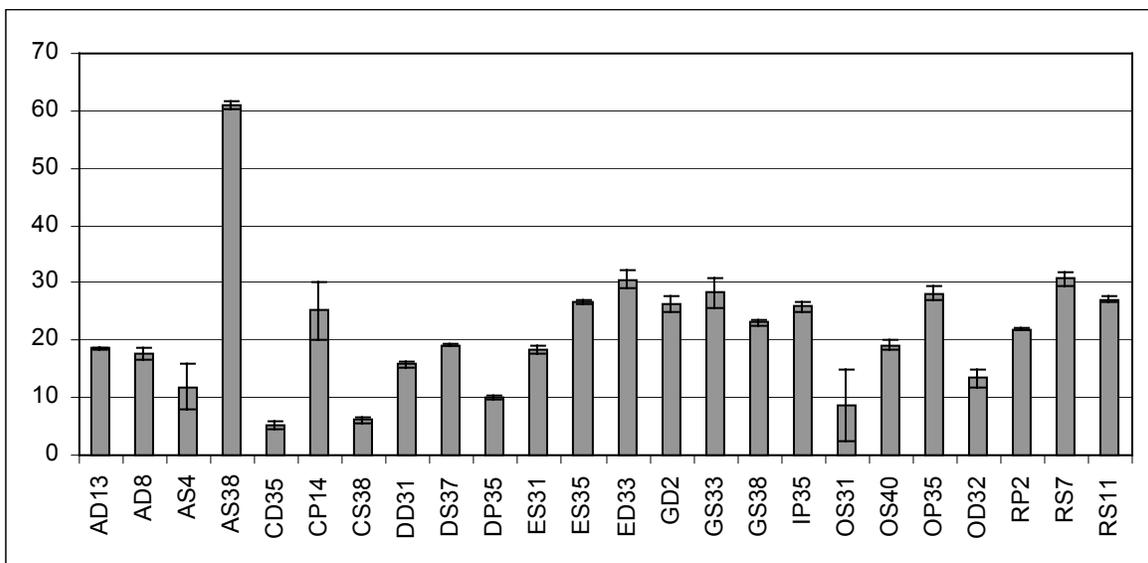


Figura 12: Valores médios de porcentagem de células aderidas ao vidro na presença de sacarose (\pm DP) entre os genótipos pertencentes ao grupo de indivíduos livres de cárie. Os valores variaram entre 5,11% a 61,06%. As análises foram realizadas em triplicata

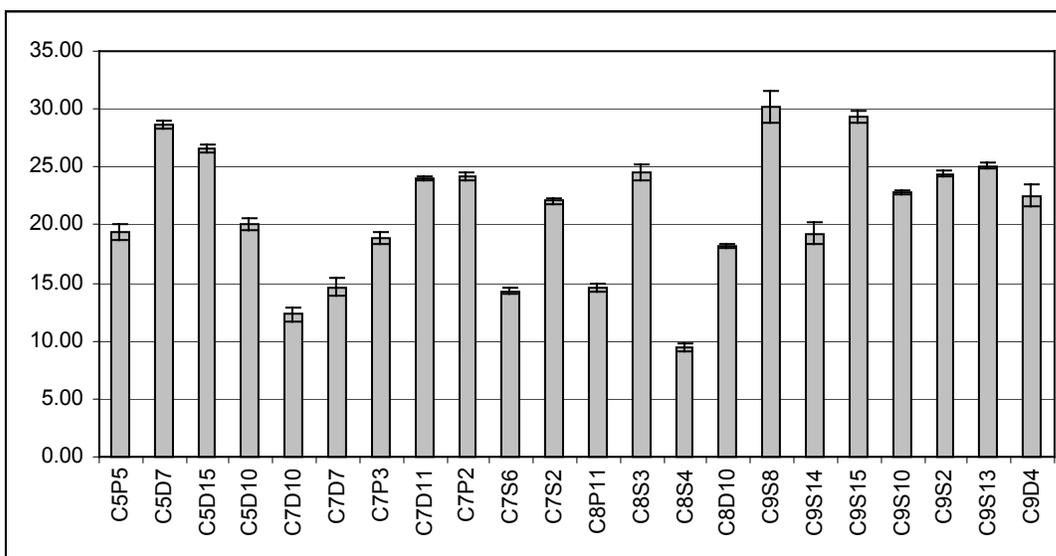
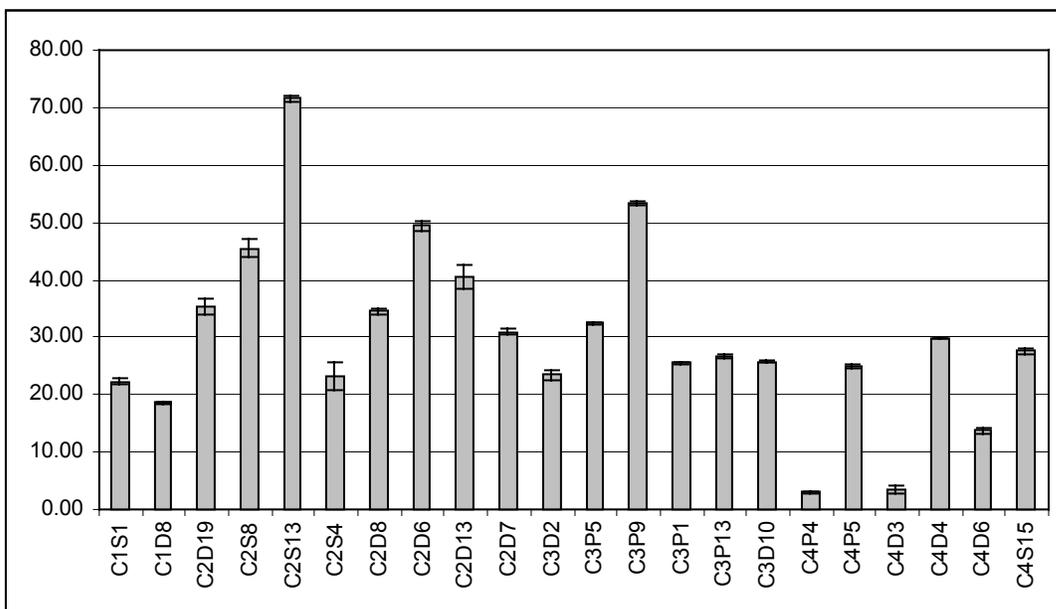


Figura 13: Valores médios de porcentagem de células aderidas ao vidro na presença de sacarose (\pm DP) entre os genótipos pertencentes ao grupo de indivíduos cárie-ativos. Os valores variaram entre 3,56% a 71,53%. As análises foram realizadas em triplicata.

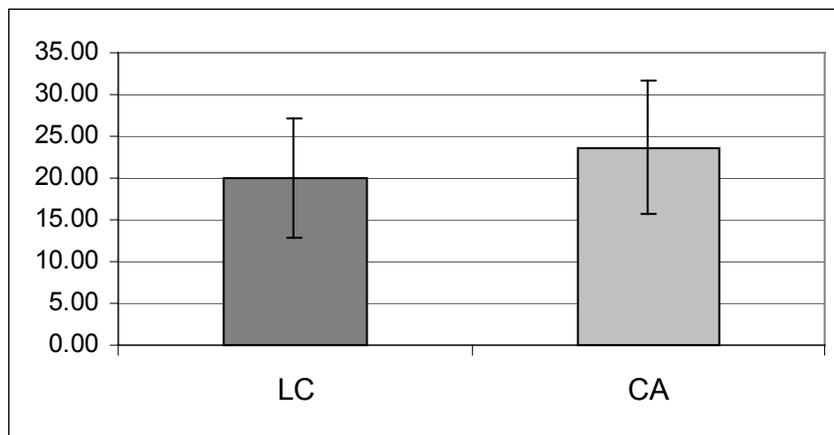


Figura 14 - Valores médios de adesão ao vidro na presença de sacarose (\pm DP), expressos em porcentagem, de *S. mutans* isolados de indivíduos livres de cárie (LC) e indivíduos cárie-ativos (CA). O teste estatístico ANOVA não demonstrou diferença entre os grupos estudados

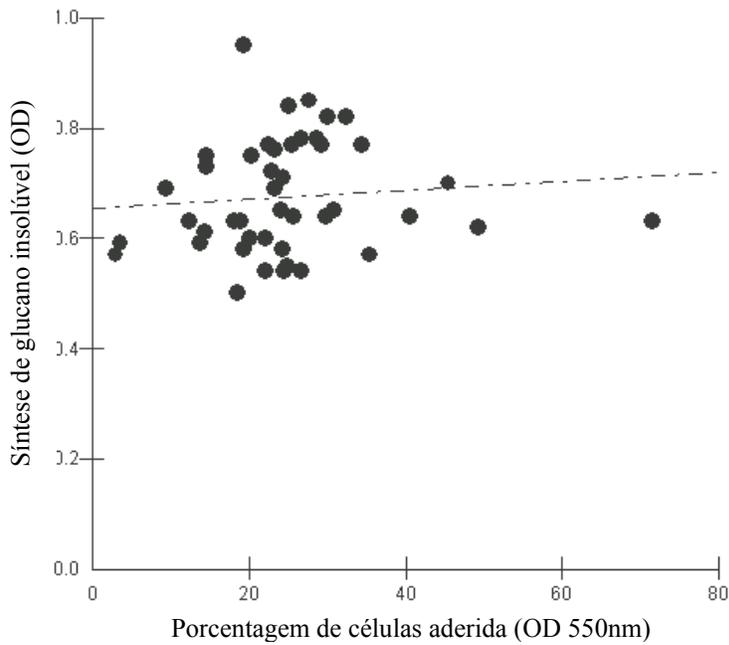


Figura 15 - Distribuição das médias dos genótipos de *S. mutans* pertencentes ao grupo de indivíduos cárie-ativos, quanto à porcentagem de células aderidas *in vitro* na presença de sacarose e a síntese de glucanos insolúveis. Observou-se uma correlação positiva estatisticamente significativa (Spearman: $r = 0,34$; $p = 0,02$).

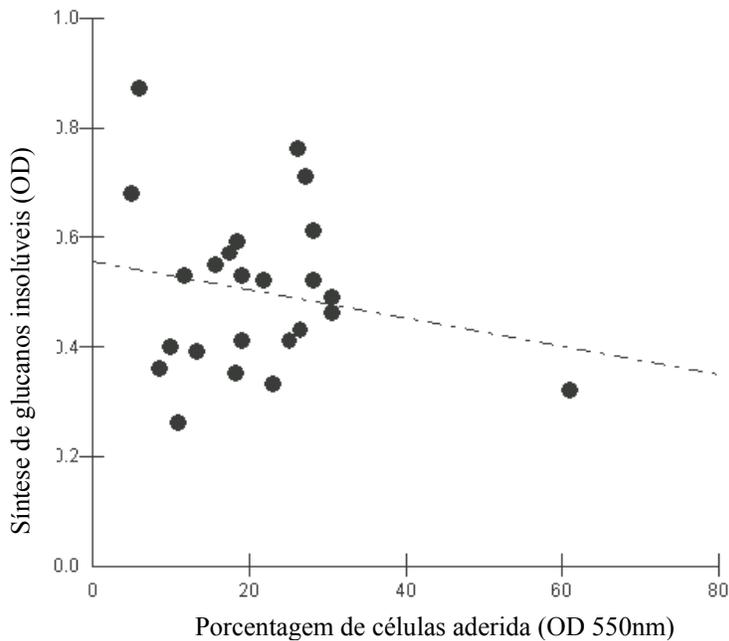


Figura 16 - Distribuição das médias dos genótipos de *S. mutans* pertencentes ao grupo de indivíduos livres de cárie, quanto à porcentagem de células aderidas *in vitro* na presença de sacarose e a síntese de glucanos insolúveis. Não foi observada uma correlação positiva estatisticamente significativa (Spearman: $r = -0,03$; $p = 0,86$).

Produção e atividade de GTF

A principal banda de GI considerada para análise densitométrica foi a correspondente a GTF de migração mais lenta, interpretada como GTF-B. Os glucanos produzidos pela GTF com migração mais rápida não foram considerados na análise densitométrica uma vez que esta GTF sintetizou menos GI, produzindo uma banda de glucanos muito fraca e de difícil quantificação. Os valores de densitometria das bandas de GTF observadas nos géis corados com *Coomassie blue* não mostraram diferença estatisticamente significativa, os valores da DO foram de 0,36 (livres de cárie) a 0,41 (cárie ativos), mostrando que a quantidade de proteínas não foi um fator limitante. A Figura 17 ilustra as bandas protéicas de GTF coradas com *Coomassie blue* e as respectivas bandas de glucano insolúvel em água, sintetizado após incubação com sacarose. Os valores normalizados da intensidade das bandas de GI variaram de 0,26 a 0,87 entre os genótipos do grupo livre de cárie (Figura 18) e entre 0,50 e 0,95 entre os genótipos provenientes do grupo composto de indivíduos cárie-ativos (Figura 19). A síntese média de GI produzidos foi significativamente maior no grupo de indivíduos cárie-ativos, quando comparada com o grupo de indivíduos livres de cárie (Mann – Whitney $p < 0,01$) e estão representados na Tabela 9. A razão de atividade enzimática de GTF também foi maior no grupo de indivíduos cárie-ativos comparado ao outro, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa ($p > 0,05$). A Figura 20 mostra a síntese média de GI nos dois grupos estudados.

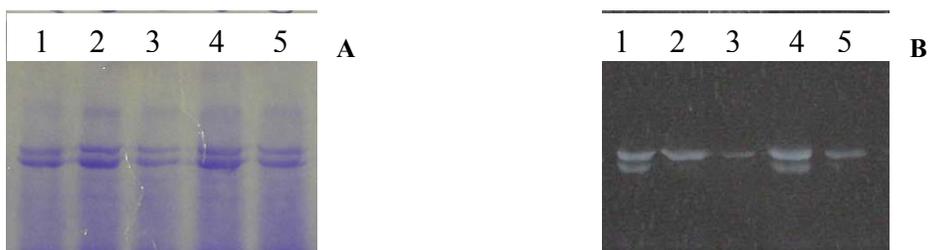


Figura 17 - Análise de géis de poliacrilamida-SDS das proteínas secretadas no sobrenadante de cultura de cepas de *S. mutans*. (A) Coloração com *Coomassie Blue* (B) Detecção da síntese de GI após incubação dos géis de poliacrilamida a 37°C em solução de sacarose 5%. As bandas superiores correspondem a GTF-B. Linhas 1, 2 e 3 correspondem a amostras de voluntários livres de cárie enquanto as linhas 4 e 5 correspondem a amostras de voluntários cárie-ativos.

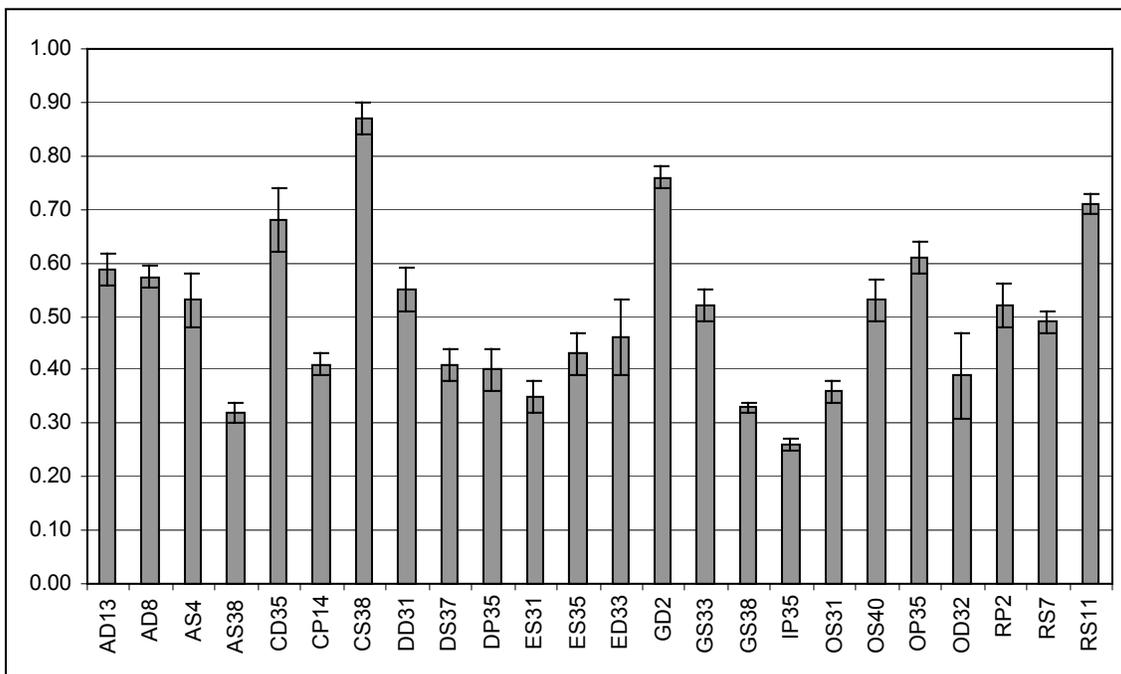


Figura 18: Síntese de glucanos insolúveis médias (\pm DP) dos genótipos de *S. mutans* provenientes de indivíduos livres de cárie. Os valores variaram de 0,26 a 0,87 unidades. As análises foram realizadas em triplicata.

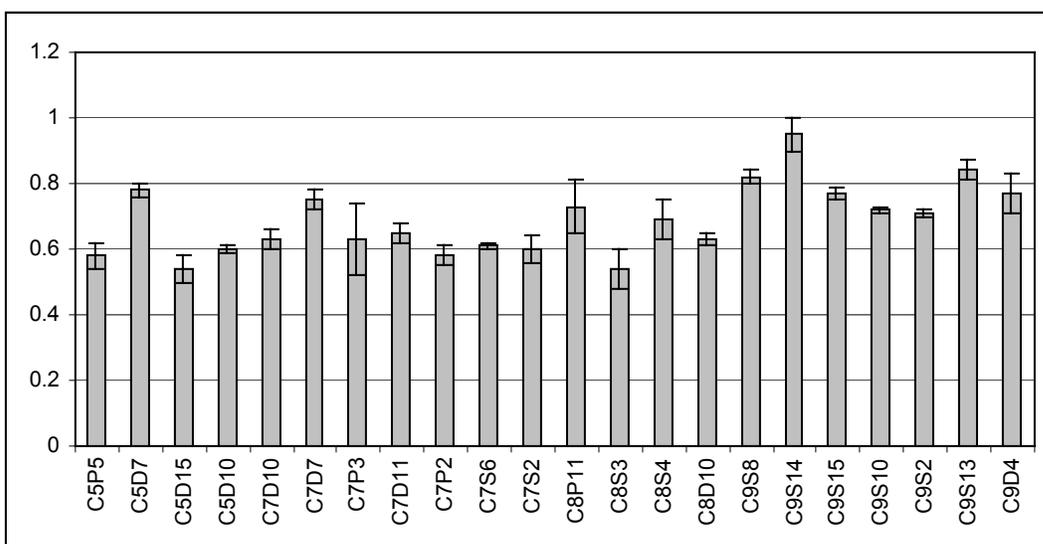
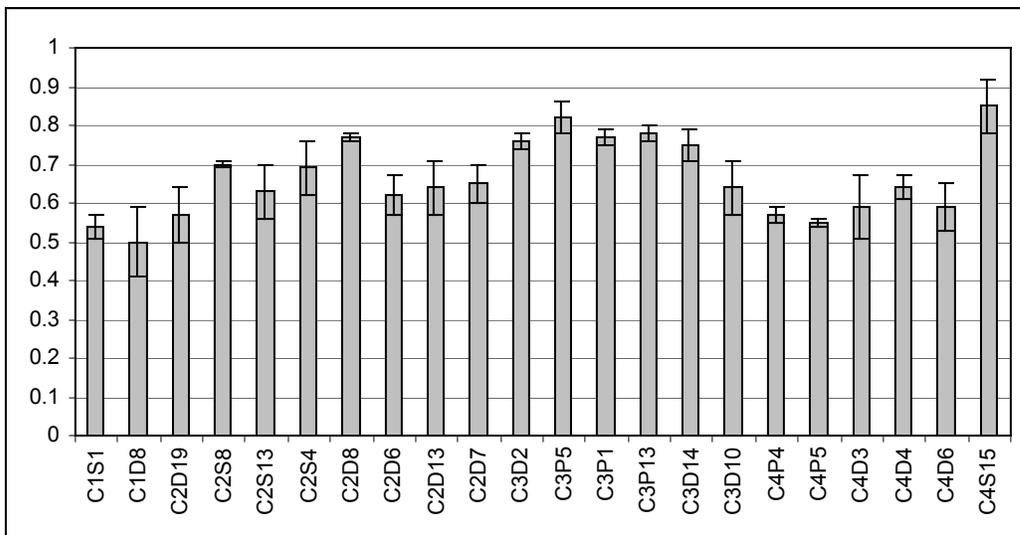


Figura 19: Síntese de glucanos insolúveis médias (\pm DP) dos genótipos de *S. mutans* provenientes de indivíduos cárie-ativos. Os valores variaram de 0,50 a 0,95 unidades. As análises foram realizadas em triplicata

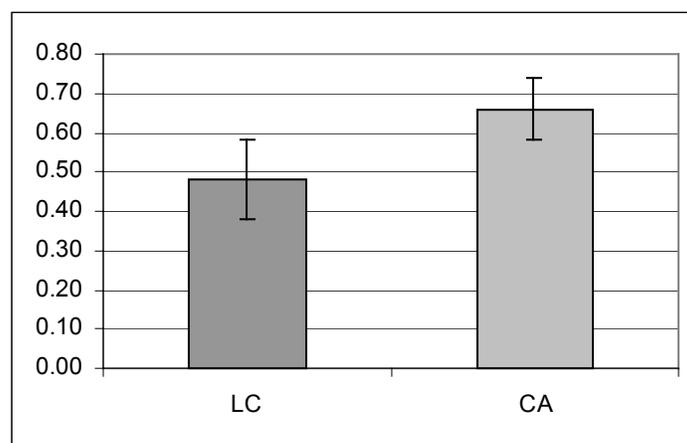


Figura 20 – Síntese média de GI por cepas de *S. mutans* isolados de indivíduos livres de cárie (LC) e indivíduos cárie-ativos (CA). A análise de variância de Mann-Whitney mostrou diferença estatisticamente significativa na intensidade média das bandas de GI nos diferentes grupos estudados

Tabela 9 – Valores médios da expressão de GTF, síntese de GI, razão de atividade de GTF, porcentagem de aderência ao vidro na presença de sacarose e pH final dos genótipos de *S. mutans* isolados de indivíduos livres de cárie e cárie-ativos.

Fatores de virulência de <i>S. mutans</i>	Livres de cárie (n=8)	Cárie-Ativos (n=8)	Teste estatístico
Produção de GTF ^a	0,36 ± 0,06	0,41 ± 0,06	Anova p = 0,13
Síntese de GI ^b	0,48 ± 0,11	0,66 ± 0,08	Mann-Whitney p < 0,01
Razão de atividade de GTF ^c	1,47 ± 0,44	1,75 ± 0,36	Anova p = 0,18
% de aderência ^d	20,02 ± 7,05	23,68 ± 8,03	Anova p = 0,62
pH final	4,27 ± 0,16	4,21 ± 0,09	Anova p = 0,32

Média ± desvio padrão

^a valores de densitometria das bandas de GTF observadas nos géis corados com *Coomassie blue*

^b valores de densitometria das bandas de GI observadas nos géis incubados com sacarose 5%

^c valores de densitometria das bandas de GI normalizados pelos valores de densitometria das bandas de GTF

^d valores de absorvância das células aderidas ao vidro dividido pelos valores de absorvância do total de células, expressos em porcentagem

6. DISCUSSÃO

Clones bacterianos podem estar associados com a maior virulência de determinadas espécies de microrganismos como demonstrado, por exemplo, em *Haemophilus influenzae* (Musser *et al.* 1988) e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Mayer *et al.*, 1999). Entretanto, pouca informação existe disponível sobre a relação entre a diversidade clonal e as características de virulência de *S. mutans* assim como seu comportamento quando comparados cepas isoladas de indivíduos livres de cárie e cárie-ativos.

Segundo Grönroos & Alaluusua (2000) e Redmo-Emanuelsson *et al.* (2003), clones de *S. mutans* colonizam sítios específicos da cavidade oral, portanto, para a realização deste trabalho, a fim de obtermos uma amostra significativa de toda cavidade oral, foram coletadas amostras de saliva, placa dental e saburra de língua dos indivíduos. Nos indivíduos com lesões de cárie ativas, a placa que recobria a lesão foi removida e utilizada na análise, pois segundo Beighton & Brailsford (1999), a presença da placa bacteriana sobre a lesão pode mudar significativamente o número de microrganismos e a composição da microbiota presente na dentina cariada, o que torna necessário a sua completa remoção. Matos-Nascimento (2002), encontrou genótipos de *S. mutans* tanto no biofilme dental sobreposto à lesão de cárie, tanto coronária como radicular, idênticos aos encontrados no interior da lesão, porém não necessariamente todos os genótipos presentes no biofilme dental foram encontrados no interior da lesão.

Estudos envolvendo bactérias, parasitas e fungos estabeleceram concordância nos resultados obtidos por AP-PCR e por MEE (Tybayrenc *et al.*1993; Wang *et al.* 1993; Brandt *et al.* 1995; Pujol *et al.* 1997) sendo que alguns sugeriram que o AP-PCR pode ser mais discriminatório quando comparado com o MEE (Tybayrenc *et al.*1993; Brandt *et al.* 1995), entretanto, o grau de reprodutibilidade e a dificuldade em comparar diferentes padrões pelo AP-PCR têm sido discutidos (Penner *et al.* 1993; Power, 1996). Já o MEE é descrito por Boerlin (1997) como uma técnica com alta reprodutibilidade, que abrange um amplo campo de aplicabilidade, desde a identificação de espécies até a diferenciação de clones de uma mesma espécie.

Com o desenvolvimento de diversas técnicas baseadas no DNA para comparação de isolados independentes de um microrganismo, passa a ser interessante verificar se estes métodos de genotipagem, de fato, apresentam poder de discriminação genética entre

amostras não relacionadas e se o método a ser utilizado, consegue discriminar entre amostras altamente relacionadas, porém de amostras distintas (Pujol *et al.*, 1997).

Os métodos comparados neste estudo mostraram um grande poder em distinguir diferenças em isolados altamente relacionados de *S. mutans*. Este dado pôde ser confirmado de acordo com os valores discriminatórios apresentados por ambas as técnicas. Hunter & Gaston, (1988), propuseram o emprego do índice de Simpson, para determinar o poder discriminatório de um método, que segundo o autor, reflete a habilidade em distinguir diferentes amostras. Os resultados encontrados foram considerados como de alto poder discriminatório para ambas as técnicas, sendo que o MEE obteve um índice de 0,971 contra 0,968 com AP-PCR. No grupo de indivíduos livres de cárie, com a técnica de MEE, foi possível detectar 27 clones em 8 diferentes indivíduos enquanto que pelo AP-PCR foram detectados 24 clones. No segundo grupo estudado, foi possível discriminar dentre 144 amostras provenientes de 8 indivíduos cárie-ativos, 51 genótipos pela técnica de MEE contra 44 por AP-PCR.

Segundo Alaluusua *et al.* (1996), um maior número de genótipos podem ser encontrados se um maior número de cepas forem estudadas, no entanto no presente estudo foi possível observar que o número de cepas analisadas não se relaciona com o número de perfis genéticos. Para ambos os grupos (livres de cárie e cárie-ativos), foram realizados testes de correlação linear de Pearson, sendo que não foram encontradas correlações estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre o número de amostras avaliadas e o número de genótipos encontrados em ambas as técnicas empregadas, permitindo concluir que a amostragem utilizada no presente estudo foi suficiente para que possamos afirmar nossas conclusões.

Diversos autores têm demonstrado existir uma diversidade genética intraindividual de *S. mutans* utilizando diferentes métodos de genotipagem (Saarela *et al.* 1996; Alaluusua *et al.* 1996; Grönroos & Alaluusua, 2000; Redmo-Emanuelsson *et al.* 2003). Porém não há um consenso sobre a relação de atividade de cárie com a diversidade genética de *S. mutans*. Alaluusua *et al.* (1996) avaliaram a diversidade de cepas de *S. mutans* em crianças livres de cárie e com cárie de mamadeira, pela análise do padrão de restrição do DNA ribossômico (ribotipagem). Estes autores identificaram mais de um ribotipo de *S. mutans* entre as crianças que apresentavam cárie rampante, enquanto que apenas uma criança livre de cárie

apresentou mais de um ribotipo sugerindo que indivíduos com maior atividade de cárie apresentam maior diversidade de clones de *S. mutans*. Por outro lado, Kreulen *et al* (1997) sugerem que clones específicos de *S. mutans* são selecionados em crianças com alta atividade de cárie. Esses autores avaliaram a diversidade de clones de *S. mutans* isolados de 7 pares de irmãos, sendo que um dos irmãos apresentava cárie rampante e o outro baixa atividade de cárie. Neste estudo, foi possível verificar que as crianças que apresentavam cárie rampante apresentavam apenas um clone de *S. mutans*, enquanto os irmãos com baixa atividade de cárie apresentavam de 2 a 5 clones distintos.

No presente estudo por ambas as técnicas empregadas, foram encontrados um maior número de genótipos na cavidade oral de indivíduos cárie-ativos quando comparado aos indivíduos livres de cárie, sendo esta diferença estatisticamente significativa (teste Newman – Keuls $p < 0,01$), corroborando estudos prévios de Alaluusua *et al.* (1996). Assim como estes autores acreditamos que a existência de múltiplos genótipos bacterianos na placa dental pode ser consequência de circunstâncias favoráveis à colonização de estreptococos do grupo mutans, onde um ambiente mais propício possa suportar este crescimento de múltiplos genótipos mais adaptados a este ambiente cariogênico, muito embora seja possível que a ação simultânea de algumas cepas com potenciais cariogênicos distintos possam elevar o risco à cárie. O biofilme dental é composto por uma comunidade bacteriana complexa, que alberga diversos microrganismos, inclusive *S. mutans*, o qual esta exposta a diversas situações de estresse fisiológico, como excesso ou limitação de nutrientes, baixo pH, alta osmolaridade, oxidação e freqüente exposição a antimicrobianos (Marsh, 2000).

A adaptação a um ambiente altamente competitivo por transformação genética, não ocorre freqüentemente, porém quando esta ocorre, pode ser altamente vantajoso para o microrganismo, podendo este adquirir um gene de resistência a antibiótico ou um fator de virulência, promovendo grande vantagem seletiva (Li *et al.*, 2001). Paddick *et al.*, (2003) avaliaram o efeito do ambiente na diversidade genotípica de *A. naeslundii* e *S. oralis* no biofilme dental proveniente de indivíduos livres de cárie e cárie-ativos. Nesse trabalho, os autores encontraram um número de genótipos de *A. naeslundii* muito próximos em ambos os grupos, porém, o número de genótipos de *S. oralis* isolados do biofilme proveniente de indivíduos cárie-ativos, foi superior, estatisticamente significativo, quando comparado com

o grupo de indivíduos livres de cárie. Os autores sugerem que devido ao constante estresse ambiental, como a queda de pH, pode alterar a diversidade ecológica do biofilme dental para algumas espécies bacterianas. Nossos resultados de maior diversidade em isolados de indivíduos cárie-ativos, sugerem que semelhantes fenômenos possam ocorrer com o *S. mutans*.

Comparações entre resultados obtidos com crianças e adultos devem ser realizadas com cuidado, devido à limitação do pleno conhecimento das diferenças existentes na ecologia oral de ambas as populações assim como o número de participantes e diferenças no número de cepas. Saarela *et al.* (1993), demonstraram a presença de ribotipos idênticos de *S. mutans* e outros microrganismos periodontopatógenos entre casais de marido e mulher, sugerindo que a presença de um maior número de ribotipos em adultos se deve ao fato de um grande número de oportunidades de transmissão ao longo dos anos. Redmo-Emanuelsson *et al.* (2003), estudaram uma população de indivíduos com CPOD variando de 3 a 16, com experiência de lesões de cáries passadas, com idade variando de 20 a 40 anos e encontraram até 7 genótipos distintos na cavidade oral destes indivíduos. Estes resultados são interessantes uma vez que no presente trabalho foi possível encontrar, independente da técnica empregada, no grupo de indivíduos livres de cárie de 1 a 4 genótipos e no grupo de cárie ativos de 2 a 11 genótipos distintos.

Emilson *et al.* (1987), demonstraram que cepas isoladas de indivíduos pertencentes a uma população com baixíssima incidência de cárie eram capazes de induzir lesões de cárie avançadas em modelo animal. Os autores sugerem que a baixa atividade de cárie apresentada por esta população não se deve a ausência de virulência dos *S. mutans* que colonizam estas pessoas, mas por outros fatores como a dieta. Em contraste Köhler & Krasse (1990) observaram que cepas de *S. mutans* isoladas de crianças livres de cárie portadoras de altos níveis de *S. mutans* demonstraram baixa cariogenicidade em modelos animais, quando comparadas com outras cepas de mesma espécie, isoladas de crianças altamente infectadas. Estas divergências encontradas na literatura demonstram a complexidade envolvida na expressão de virulência por microrganismos cariogênicos.

No presente estudo, o pH final das cepas de *S. mutans* provenientes de indivíduos cárie-ativos apresentaram valores ligeiramente mais baixos do que as cepas do grupo de indivíduos livres de cárie, porém, não foi possível estabelecer uma correlação entre os

valores de pH final e o índice de cárie dos indivíduos. Em concordância a estes resultados Köhler *et al.* (1995) e Mattos-Graner *et al.* (2000), também não demonstraram nenhuma relação entre a acidogenicidade e a atividade de cárie em cepas de *S. mutans* isoladas de humanos com alto e baixo índice de cárie. Estes resultados demonstram que outros fatores além da produção de ácido são de grande importância no desenvolvimento da cárie, como alterações na microbiota oral, fatores salivares, exposição ao flúor e a frequência de ingestão de açúcares fermentáveis (Tanzer, 1989). De acordo com van Palestein-Helderman *et al.* (1996), as diferenças na experiência de cárie são mais bem explicadas em função de hábitos dietéticos do indivíduo que pela espécie bacteriana envolvida.

A síntese de glucanos insolúveis a partir de sacarose é um importante fator de virulência de *S. mutans*, permitindo o acúmulo destes microrganismos nas superfícies dos dentes (Smith & Taubman, 1997). Ooshima *et al.* (2001) realizaram estudos utilizando cepas mutantes deficientes em um, dois ou três genes que codificam as GTF-B, GTF-C e GTF-D, demonstrando que na ausência de um ou mais genes as cepas são capazes de aderirem significativamente menos ao vidro na presença de sacarose quando comparado a uma cepa selvagem. Estudos realizados em modelos animais utilizando cepas que não expressam GTF-B e GTF-C produziram significativamente um menor número de lesões de cárie em superfícies dentárias lisas e oclusais em ratos, quando comparada com cepas selvagens (Yamashita *et al.* 1992).

A capacidade de aderência dos *S. mutans* não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados, apesar de a média apresentada pelas cepas de *S. mutans* proveniente dos indivíduos cáries-ativos terem sido ligeiramente superior. Estes dados estão de acordo com Mattos-Graner *et al.* (2000), entretanto, os valores da síntese de glucanos insolúveis demonstraram correlação positiva significativa com a porcentagem de células aderidas *in vitro* na presença de sacarose pelos *S. mutans* provenientes do grupo de indivíduos cárie-ativos, mas não quando comparadas com amostras provenientes de indivíduos livres de cárie, sugerindo que amostras de *S. mutans* isolados de indivíduos cárie-ativos são melhores colonizadores e possivelmente possuem maior capacidade de induzir cárie. A atividade de enzimas GTF-B e GTF-C está associada com a aderência sacarose-dependente em superfícies lisas tanto em experimentos *in vitro* (Tsumori & Kuramitsu, 1997), como em modelos animais (Smith *et al.*, 1982).

A ligação bacteriana aos glucanos sintetizados pelas GTFs pode ser mediada por proteínas ligantes de glucano (GBPs) associadas à parede celular. Muitas proteínas com propriedades de ligar glucano têm sido identificadas em *S. mutans*, como a GBP-A, GBP-B e GBP-C, embora suas funções biológicas não estejam esclarecidas.

Nossos resultados mostraram que as cepas de *S. mutans* dos indivíduos cárie-ativos apresentaram uma síntese de glucanos insolúveis maior, sendo esta diferença estatisticamente significativa, comparada às cepas de indivíduos livres de cárie corroborando resultados encontrados por Mattos-Graner (2000). Esta diferença encontrada na produção de glucanos insolúveis não está relacionada com uma possível diferença na quantidade de proteínas utilizadas, visto que os valores da densitometria das GTFs não mostraram diferença estatisticamente significativa. Estes dados estão de acordo com estudos de Alaluusua *et al.*, (1997), os quais não observaram relação positiva entre a atividade de cárie e a produção de GTF produzida por cepas de *S. mutans* isoladas de crianças livres de cárie e com cárie de mamadeira.

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

7. CONCLUSÕES

1. As técnicas de MEE e AP-PCR foram eficazes e discriminatórias na genotipagem de *Streptococcus mutans*.
2. Existe um maior número de genótipos de *S. mutans* em indivíduos cárie-ativos comparado a indivíduos livres de cárie.
3. Não houve diferença entre os valores de pH final e entre a capacidade de adesão ao vidro na presença de sacarose das cepas de *S. mutans* e a presença de cárie.
4. Existe uma maior síntese de glucanos insolúveis entre cepas de *S. mutans* de indivíduos cárie-ativos comparado a de indivíduos livres de cárie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Alaluusua S, Renkonen OV. *Streptococcus mutans* establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. Scand J Dent Res 1983; 91:453-457.
2. Alaluusua S, Mattö J, Grönroos L, Innila S, Torkko H, Asikainem S, Jousimies-Somer H, Saarela M. Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. Arch Oral Biol 1996; 41:167-73.
3. Alaluusua S, Grönroos L, Zhu X, Saarela M, Mattö J, Asikainem S, Fukushima K. Production of glucosyltransferases by clinical mutans streptococcal isolates as determined by semiquantitative cross-dot assay. Archs Oral Biol 1997; 42:417-422.
4. Beighton D Rippon HR, Thomas HEC. The distribution of *Streptococcus mutans* serotypes and dental caries in a group of 5- to 8-year-old Hampshire schoolchildren. Br Dent J 1987; 162:103-106.
5. Beighton D, Brailsford SR. Plaque microbiology of root caries. In: Edgar WM, O'Mullane DM (eds). Saliva and Oral Health, 2 ed. London: British Dental Association; 1999. p.295-313.
6. Boerlin P. Applications of multilocus enzyme electrophoresis in medical microbiology. J Microbil Meth 1997; 28:221-231.
7. Bowen WH. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? Crit Rev Oral Biol Med 2002; 13:126-131.
8. Brandt ME, Bragg SL, Pinner RW. Multilocus enzyme typing of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol 1995; 31:2819-2823.
9. Bratthall D. Caries, views and perspectives. Scand J Dent Res 1992; 100:47-51.
10. Brown AT, Patterson CE. Heterogeneity of *Streptococcus mutans* strains based on their manitol-1-phosphate dehydrogenases: criterion for rapid classification. Infect Immun 1972; 6: 422-424.
11. Caufield PW, Walker TM. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphism. J Clin Microbiol 1989; 27:274-278.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

12. Caufield PW. Dental caries – a transmissible and infectious disease revisited: a position paper. *Pediatr Dent* 1997; 19:491-498.
13. Carlsson P, Olsson B, Bratthall D. The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique. *Arch Oral Biol* 1985; 30:265-268.
14. de Soet JJ, van Loveren C, Lammens AJ, Pavicic MJAMP, Homburg CHE, ten Cate JM, de Graaf J. Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries Res* 1991; 25:116-122.
15. Dixon M, Webb EC. *Enzymes*. 3 ed. New York: Academic Press; 1979.
16. Emilson CG, Carlsson P, Bratthall D. Strains of mutans streptococci isolated in a population with extremely low caries prevalence are cariogenic in the hamster model. *Oral Microbiol Immunol* 1987; 2:183-186.
17. Gibbons RJ, van Houte J. Dental caries. *Annu Rev Med* 1975; 26:121-136.
18. Gibbons RJ. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *J Dent Res* 1984; 63:378-385.
19. Gilmour MN, Whittam TS, Kilian M, Selander RK. Genetic relationships among the oral streptococci. *J Bacteriol* 1987; 69: 5247-5257.
20. Gold OG, Jordan HV, van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1973; 18:1357-1364.
21. Gonçalves RB, Rosa RT, Stipp RN, Napimoga MH, Rosa EAR, Höfling JF. Genetic diversity and cariogenic potential of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 2002; 81:286.
22. Grindefjord M, Dahllöf G, Modéer T. Caries development in children from 2.5 to 3.5 years of age: a longitudinal study. *Caries Res* 1995; 29: 449-454.
23. Grönroos L, Alaluusua S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. *Caries Res* 2000; 34:474-80.
24. Hajishengallis G, Michalek SM. Current status of a mucosal vaccine against dental caries. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14:1-20.
25. Hamada S, Tori M. Effect of sucrose in culture media on the location of glycosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surface.

- Infect Immun 1978; 20:592-599.
26. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 1980; 44:331-384.
 27. Hanada N, Kuramitsu H. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* *gtfC* gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. Infect Immun 1988; 56:1999-2005.
 28. Hardie JM. Oral Streptococci. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, v.2. Baltimore; 1986. p.1054-1063.
 29. Harris H. Isoenzymes. 4. ed. New York: Academic Press; 1975.
 30. Hazlett KRO, Michalek SM, Banas JA. Inactivation of the *gbpA* gene of *Streptococcus mutans* increases virulence and promotes *in vivo* accumulation of recombinants between the glucosyltransferase B and C genes. Infect Immun 1998; 66:2180-2185.
 31. Honda O, Kati C, Kuramitsu HK. Nucleotide sequence of the *Streptococcus mutans* *gtfD* gene encoding the glucosyltransferase-S enzyme. J Gen Microbiol 1990; 136:2099-2105.
 32. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol 1988; 28:1903-1905.
 33. Kamiya RU. Análise genotípica e mutacinotipagem de *Streptococcus mutans* isolados de indivíduos cárie-ativos e livres de cárie. [Tese] Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2003.
 34. Klein MI. Transmissão, diversidade e estabilidade de genótipo de *Streptococcus mutans* e de *Streptococcus sobrinus*: estudo longitudinal em crianças. [Tese] Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2003.
 35. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. Annu Rev Microbiol 2000; 54: 413-37.
 36. Köhler B, Bratthall D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. J Clin Microbiol 1979; 9:584-588.
 37. Köhler B, Andréen I, Jonsson B. The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at 4 years of age. Oral Microbiol

- Immunol 1988; 3:14-17.
38. Köhler B, Krasse B. Human strains of mutans streptococci show different cariogenic potential in the hamster model. *Oral Microbiol Immunol*. 1990; 5:177-180.
 39. Köhler B, Birkhed D, Olsson S. Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries Res* 1995; 29:402-406.
 40. Kreulen CM, de Soet HJ, Hogeveen R, Weerkamp JS. *Streptococcus mutans* in children using nursing bottles. *ASDC J Dent Child* 1997; 64:107-11.
 41. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
 42. Li Y, Caulfield PW. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. *J Dent Res* 1995; 74:681-685.
 43. Li Y, Caulfield PW. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13:17-22.
 44. Li Y-H, Lau PCY, Lee JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J Bacteriol* 2001; 183:897-908.
 45. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986; 50:353-80.
 46. MacPherson JM, Eckstein PE, Scoles GJ, Gajadhar AA. Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effect of primer and DNA concentration. *Mol Cellul Probes* 1993; 7:293-299.
 47. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Host parasite relationship. *In*: Madigan MT, Martinko JM, Parker J (eds). *Brock biology of microorganisms*. New Jersey: Prentice Hall; 1997. p.785-812.
 48. Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russel JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of

- pathogenic microorganism. Proc Natl Acad Sci 1998; 95:3140-3145.
49. Marsh PD. Oral ecology and its impact on oral microbial diversity *In* Kuramitsu HK, Ellen RP (eds) Oral bacterial ecology: the molecular basis. Norfolk: Horizon Scientific Press; 2000.
 50. Mata AL, Rosa RT, Rosa EAR, Gonçalves RB, Höfling JF. Clonal variability among oral *Candida albicans* assessed by allozyme electrophoresis analysis. Oral Microbiol Immunol 2000; 15:350-354.
 51. Matee MIN, Mikx FHM, de Soet JS, Maselle SY, de Graff J, van Palestein-Helderman, WH. Mutans streptococci in caries-active and caries-free infants in Tanzania. Oral Microbiol Immunol 1993; 8:322-324.
 52. Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MP. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12 to 30-months-old children. J Dent Res 2000; 79:1371-77.
 53. 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 2001a; 69:6931-6941.
 54. 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 2001b; 39:2313-2316.
 55. Matos-Nascimento M. Polimorfismo genético de *Streptococcus mutans* isolados da cavidade oral de indivíduos com lesões de cáries coronária e radicular. [Tese] Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2002.
 56. Mayer MPA, Bueno LC, Hansen EJ, Dirienzo JM. Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect Immun 1999; 67:1227-1237.
 57. Musser JM, Hewlett EL, Peppler MS, Selander RK. Genetic diversity and

- relationships in populations of *Bordetella ssp.* J Bacteriol 1986; 166:230-237.
58. Musser JM, Kroll JS, Moxon ER, Selander RK. Clonal population structure of encapsulated *Haemophilus influenzae*. Infect Immun 1988; 56:1837-1845.
59. Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushiama M, Koga T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by Polimerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol 2000; 15:258-262.
60. Ooshima T, Matsumura M, Hoshino T, Kawabata S, Sobue S, Fujiwara T. Contributions of three glucosyltransferase to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. J Dent Res 2001; 80:1672-1677.
61. Organização mundial de saúde. In: Oral health surveys: basic methods, 4.ed. Geneva; 1997.
62. Paddick JS, Brailsford SR, Kidd EA, Gilbert SC, Clark DT, Alam S, Killick ZJ, Beighton D. Effect of the environment on genotypic diversity of *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus oralis* in the oral biofilm. Appl Environ Microbiol 2003; 69:6475-6480.
63. Penner GA, Bush A, Wise R, Kim W, Domier L, Kasha K, Laroche A, Scoles G, Molnar SJ, Fedak G. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analisys among laboratories. PCR Meth Applic 1993; 2:341-345.
64. Power EG. RAPD typing in microbiology – a technical review. J Hosp Infect 1996; 34:247-256.
65. Prakash S, Lewontin RC, Hubby JL. A molecular approach to the study of genic heterozigosity in natural populations. IV patterns of genetic variation in central, marginal and isolated population of *Drosophila pseudibscura*. Genetics 1969; 61:841-58.
66. Pujol C, Joly S, Lockhart SR, Noel S, Tybayrenc M, Soll DR. Parity among the randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis,

- and southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1997; 35:2348-2358.
67. 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; 18:24-29.
 68. Rosa EAR, Pereira CV, Rosa RT, Höfling JF. Grouping oral *Candida* species by multilocus enzyme electrophoresis. Int J Syst Evol Microbiol 2000; 50:1343-1349.
 69. Rosa RT. Detecção do polimorfismo genético de *Streptococcus mutans* isolados de indivíduos livres de cárie (CPOD = 0). [Tese] Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2001.
 70. Rosa RT, Rosa EAR, Napimoga MH, Höfling JF, Gonçalves RB. Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* strains isolated from caries-free subjects. J Dent Res 2002; 81 Spec Iss B:153.
 71. Saarela M, von Troil-Lindén B, Torkko H, Stucki AM, Alaluusua S, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Transmission of oral bacteria species between spouses. Oral Microbiol Immunol 1993; 8:349-354.
 72. Saarela M, Hannula J, Mattö J, Asikainen S, Alaluusua S. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. Arch Oral Biol 1996; 41:821-26.
 73. Selander RK, Levin BR. Genetic diversity and structure In: *Escherichia coli* populations. Science 1980; 210:545-547.
 74. Selander RK, McKinney RM, Whittam TS, Bibb WF, Brenner DJ, Nolte FS. Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. J Bacteriol 1985; 163:1021-1037.
 75. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl Environm Microbiol 1986; 51:873-884.

76. Shiroza T, Ueda S, Kuramitsu HK. Sequence analysis of the *gtfB* gene from *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 1987; 169:4263-4270.
77. Shklair IL, Keene HJ. A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1974; 19:1079-1081.
78. Smith DJ, Taubman MA, Ebersole JL. Effects of local immunization with glucosyltransferase on colonization of hamsters by *Streptococcus mutans*. Infect Immun 1982; 37:656-661.
79. Smith DJ, Taubman MA. Vaccines against dental caries infection. In: Levine MM, Woodrow GC, Kraper JB, Cobon GS. New generation of vaccines. New York: Marcel Dekker, 1997; p.913-930.
80. Tanzer JM. On charging the cariogenicity chemistry of coronal plaque. J Dent Res 1989; 68:1576-1587.
81. Taubman MA, Smith DJ, King WF, Berghey EJ, Levine MJ. Immune properties of glucosyltransferases from *S. sobrinus*. J Oral Pathol 1988; 17:466-470.
82. Tsumori H, Kuramitsu HK. The role of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases in the sucrose-dependent attachment to smooth surfaces: essential role of the Gtf C enzyme. Oral Microbiol Immunol 1997; 12:274-280.
83. Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Sharecky D, Ayala FJ. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. Proc Natl Acad Sci 1993; 90:1335-1339.
84. van Houte J, Lopman J, Kent R. The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. J Dent Res 1996; 75:1008-1014.
85. van Palestein-Helderman WH, Matee MI, van der Hoeven JS, Mikx FH.

- Cariogenicity depends more on diet than the prevailing mutans streptococcal species. *J Dent Res* 1996; 75:535-545.
86. Venkateswarlu K, Denning DW, Manning NJ, Kelly SL. Resistance to fluconazole in *Candida albicans* isolates obtained from AIDS patients correlated with reduced intracellular accumulation of drug. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 131:337-341.
87. Venkitaraman AR, Vacca-Smith AM, Kopec LK, Bowen WH. Characterization of glucosyltransferase B, GtfC and Gtf D in solution and on the surface of hydroxyapatite. *J Dent Res* 1995; 74:1695-1701.
88. Wang G, Whittam TS, Berg CM, Berg DE. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguish related bacterial strains. *Nucleic Acids Res* 1993; 19: 5275-5279
89. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with random primers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:7213-7218.
90. Whittenbury R. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *J Gen Microbiol* 1964; 35:13-26.
91. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski LA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:6531-6535.
92. Yamashita Y, Bowen WH, Kuramitsu HK. Molecular analysis of a *Streptococcus mutans* strain polymorphism in the tandem *gtfB* and *gtfC* genes. *Infect Immun* 1992; 60:1618-1620.
93. 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; 61:3811-3817.