

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

REGIANNE UMEKO KAMIYA  
Cirurgiã-Dentista

ANÁLISE GENOTÍPICA E MUTACINOTIPAGEM DE  
*Streptococcus mutans* ISOLADOS DE VOLUNTÁRIOS  
CÁRIE-ATIVOS E LIVRES DE CÁRIE

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Biologia Buco Dental, Área de Concentração em Microbiologia & Imunologia.

PIRACICABA  
2003

**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

REGIANNE UMEKO KAMIYA  
Cirurgiã-Dentista

ANÁLISE GENOTÍPICA E MUTACINOTIPAGEM DE  
*Streptococcus mutans* ISOLADOS DE VOLUNTÁRIOS  
CÁRIE-ATIVOS E LIVRES DE CÁRIE

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Biologia Buco Dental, Área de Concentração em Microbiologia & Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Prof. Dr. José Francisco Höfling

Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos-Graner

PIRACICABA

2003

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
de acordo com a Resolução CPG: 03/1983  
CPG. 04/10/2003  
Assinatura do Orientador

UNIDADE	BR
Nº CHAMADA/UNICAMP	K128a
V	EX
TOMBO BCI	54246
PROC.	124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/10/03
Nº CPD	

CM00185228-9

BIB ID 293786

### Ficha Catalográfica

K128a	<p>Kamiya, Regianne Umeko.  Análise genotípica e mutacinotipagem de <i>Streptococcus mutans</i> isolados de voluntários cárie-ativos e livres de cárie. /  Regianne Umeko Kamiya. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2003.  xv, 133p. : il.</p> <p>Orientador : Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves.  Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,  Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. <i>Streptococcus mutans</i>. 2. Cáries dentárias. I. Gonçalves,  Reginaldo Bruno. II. Universidade Estadual de Campinas.  Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p>
-------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2003, considerou a candidata REGIANNE UMEKO KAMIYA aprovada.

1. Prof. Dr. REGINALDO BRUNO GONCALVES

2. Prof. Dr. JOSE FRANCISCO HOFLING

3. Profa. Dra. RENATA O. MATTOS-GRANER

815028006

# DEDICATÓRIA

*A Deus*

*Agradeço por mais um trabalho realizado e pela presença constante, em todas as minhas realizações.*

*Aos meus queridos pais, Fujio e Julieta, minha eterna gratidão pelo amor incondicional, pelo carinho, apoio, incentivo e pela inspiração. Dedico-lhes todas as minhas conquistas, pois a vossa luta torna os meus conhecimentos infundáveis e transforma meu caminho em grandes oportunidades.*

*Aos meus irmãos, Rosana, Rogério, Ricardo, Humberto e Patrícia, grandes amigos e companheiros e que, com certeza, ajudaram-me a crescer como ser humano. Agradeço pelo incentivo, pelo apoio, pelas orações e principalmente por tornar nossa família mais feliz com a Amanda, Ana Paula, Lucca e Henrique.*

*À Carmo, agradeço por todo o apoio e o carinho dados a mim e a toda minha família.*

*Ao Reinaldo, agradeço pelo carinho, pela compreensão, pelo incentivo, amor e, principalmente, por fazer-me tão feliz.*

*Com Carinho,  
Dedico*

# AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves**, pelas oportunidades, pelos incentivos e principalmente agradeço pela orientação e importante contribuição à minha formação científica.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do **Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho** (Diretor) e do **Prof. Dr. Carlos Henrique de Brito Cruz** (Reitor).

Ao **Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho**, coordenador dos cursos de Pós-Graduação e às secretárias **Érika A. Pinho** e **Sônia M. L. Arthur** da Coordenadoria de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP.

À **Profa. Dra. Silvana Pereira Barros**, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP/UNICAMP.

Aos examinadores da minha tese, **Prof. Dr. José Francisco Höfling**, **Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidório** e **Profa. Dra. Renata Oliveira Mattos-Graner**, pela avaliação deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. José Francisco Höfling**, por me receber no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP/UNICAMP, por contribuir para a minha formação científica e para a concretização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidório** e ao **Prof. Dr. Luís Carlos Spolidório**, pela confiança, pelo incentivo e exemplo profissional e pessoal.

À **Profa. Dra. Renata Oliveira Mattos-Graner**, pela contribuição e pelo exemplo profissional.

Ao **Prof. Dr. Celso Paulino da Costa** (*in memoriam*), pela amizade, por despertar meus interesses e contribuir para a minha formação de mestre.

Às minhas grandes amigas de Pós-Graduação **Rita** e **Marlise**, pela cumplicidade, amizade sincera e companheirismo.

Aos meus queridos amigos **Meire**, **Ana Cláudia** e **Rogério** pelo incentivo, pela ajuda constante antes e durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos de Graduação, **Simone**, **Emy** e **Roberto** pela torcida e vibração a cada vitória de minha vida, e principalmente pelo apoio em momentos difíceis.

Aos colegas de Laboratório **Thaís**, **Flávia**, **Rafael**, **Iriana**, **Letícia**, **Marcelle**, **Marcelo Napimoga**, **Wagner**, **Marcelo Boriollo**, **Magda** e **Janáina**.

Aos funcionários da Área da Microbiologia e Imunologia, **Anderson**, **Wilma** e **Flávia**, pela disposição, pelo auxílio e principalmente pelo respeito e amizade.

Ao Departamento de Morfologia, Área de Histologia, na pessoa do **Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line**

À instituição de fomento **CAPES**, pelo apoio financeiro e concessão de bolsa.

À instituição de fomento **FAPESP** e **FAEP**, pelos recursos financeiros concedidos.

Aos voluntários da pesquisa e a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho

Muito Obrigada!

## SUMÁRIO

<b>Listas</b> .....	01
Listas de tabelas.....	01
Listas de ilustrações.....	01
Listas de abreviaturas, siglas e palavras em outro idioma.....	04
<b>Resumo</b> .....	07
<b>Abstract</b> .....	09
<b>1. Introdução</b> .....	11
<b>2. Revisão de Literatura</b> .....	13
2.1. Estreptococos grupo mutans e cárie dental.....	13
2.2. Outros fatores - Cárie Dental .....	14
2.3. Bacteriocinas – Definição.....	19
2.4. Mutacinas.....	20
2.4.1. Mutacinas – Produção e Propriedades.....	21
2.4.2. Mutacinas – Interação Ecológica e Cárie Dental.....	22
2.4.3. Classificação das Mutacinas.....	24
2.5. Genética das Bacteriocinas.....	28
2.6. Bacteriocinotipagem e Mutacinotipagem.....	33
2.7. Métodos de Tipagem Moleculares.....	37
<b>3. Proposição</b> .....	43
<b>4. Metodologia</b> .....	45
4.1. Seleção dos Voluntários.....	45

4.2. Colheita das Amostras.....	45
4.3. Isolamento e Caracterização.....	46
4.4. Mutaciotipagem.....	46
4.5. AP-PCR.....	51
<b>5. Resultados.....</b>	<b>57</b>
5.1. Mutaciotipagem.....	57
5.2. Mutaciotipagem x AP-PCR.....	58
5.2.1. Diversidade Fenotípica x Genotípica.....	59
5.2.2. Coeficientes de Contingência.....	60
5.2.3. Dendogramas e Tabelas de Contingência.....	61
5.2.4. Capacidade Discriminatória.....	87
5.2.5. Análise Adicional.....	89
<b>6. Discussão.....</b>	<b>91</b>
<b>7. Conclusão.....</b>	<b>103</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>105</b>
<b>Obras Consultadas.....</b>	<b>123</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>125</b>

# LISTAS

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1:	Sistema para transformação da produção de bacteriocina contra 3 cepas indicadoras em um único valor numérico.....	50
Tabela 2:	Agrupamento das 13 cepas indicadoras em 5 trios – Sistema Digital.....	51
Tabela 3:	Seqüência dos <i>Primers</i> Arbitrários.....	52
Tabela 4:	Total de cepas de <i>S. mutans</i> analisadas, perfis fenotípicos e genotípicos encontrados em cada voluntário do grupo cárie-ativo.....	59
Tabela 5:	Total de cepas de <i>S. mutans</i> analisadas, perfis fenotípicos e genotípicos encontrados em cada voluntário do grupo livre de cárie.....	59
Tabela 6:	Tabela de Contingência para associação de dados do voluntário A.....	63
Tabela 7:	Tabela de Contingência para associação de dados do voluntário C.....	64
Tabela 8:	Tabela de Contingência para associação de dados do voluntário D.....	66
Tabela 9:	Tabela de Contingência para associação de dados do voluntário E.....	68
Tabela 10:	Tabela de Contingência para associação de dados do voluntário G.....	70
Tabela 11:	Tabela de Contingência para associação de dados do voluntário I.....	72
Tabela 12:	Tabela de Contingência para associação de dados do voluntário O.....	74
Tabela 13:	Tabela de Contingência para associação de dados do voluntário R.....	75
Tabela 14:	Tabela de Contingência para associação de dados do voluntário C1.....	77
Tabela 15:	Tabela de Contingência para associação de dados do voluntário C2.....	78
Tabela 16:	Tabela de Contingência para associação de dados do voluntário C3.....	80
Tabela 17:	Tabela de Contingência para associação de dados do voluntário C4.....	81
Tabela 18:	Tabela de Contingência para associação de dados do voluntário C5.....	82
Tabela 19:	Tabela de Contingência para associação de dados do voluntário C7.....	84

Tabela 20:	Tabela de Contingência para associação de dados do voluntário C8.....	85
Tabela 21:	Tabela de Contingência para associação de dados do voluntário C9.....	87
Tabela 22:	Índices de discriminação da AP-PCR e Mutacinotipagem de <i>S. mutans</i> ....	88
Tabela 23:	Número de isolados e de genótipos encontrados por sítio.....	89

## LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Organização dos clusters de genes de biossíntese de lantibióticos bem caracterizados.....	30
Figura 2:	Mutacinotipagem – Inoculação das cepas testes.....	48
Figura 3:	Mutacinotipagem – Técnica do <i>Pour Plate</i> .....	49
Figura 4:	Extração e Amplificação de DNA de <i>S. mutans</i> .....	53
Figura 5:	Atividade Mutacinogênica <i>in vitro</i> pela Técnica do Antagonismo Proposto Modificado, placa com 16 cepas testes com inoculações eqüidistantes.....	55
Figura 6:	Fotografia do Gel de Agarose, demonstrando a diversidade genética de <i>S. mutans</i> em um mesmo voluntário (OPA-02).....	55
Figura 7:	Fotografia do Gel de Agarose, demonstrando a diversidade genética de <i>S. mutans</i> em um mesmo voluntário (OPA-13).....	55
Figura 8:	Gráfico da porcentagem de <i>S. mutans</i> isolados de voluntários cárie-ativos e livres de cárie produtores de mutacina contra as 13 cepas indicadoras....	58
Figura 9:	Gráfico das médias e intervalos de confiança do número de fenótipos obtidos por Mutacinotipagem dos grupos cárie-ativo e livre de cárie.....	60
Figura 10:	Gráfico das médias e intervalos de confiança do número de genótipos obtidos por AP-PCR dos grupos cárie-ativo e livre de cárie.....	60
Figura 11:	Dendograma representativo do agrupamento genotípico de <i>S. mutans</i> presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário A.....	62

Figura 12: Dendograma representativo do agrupamento genotípico de <i>S. mutans</i> presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C.....	64
Figura 13: Dendograma representativo do agrupamento genotípico de <i>S. mutans</i> presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário D.....	65
Figura 14: Dendograma representativo do agrupamento genotípico de <i>S. mutans</i> presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário E.....	67
Figura 15: Dendograma representativo do agrupamento genotípico de <i>S. mutans</i> presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário G.....	69
Figura 16: Dendograma representativo do agrupamento genotípico de <i>S. mutans</i> presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário I.....	71
Figura 17: Dendograma representativo do agrupamento genotípico de <i>S. mutans</i> presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário O.....	73
Figura 18: Dendograma representativo do agrupamento genotípico de <i>S. mutans</i> presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário R.....	75
Figura 19: Dendograma representativo do agrupamento genotípico de <i>S. mutans</i> presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C1.....	76
Figura 20: Dendograma representativo do agrupamento genotípico de <i>S. mutans</i> presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C2.....	78
Figura 21: Dendograma representativo do agrupamento genotípico de <i>S. mutans</i> presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C3.....	79
Figura 22: Dendograma representativo do agrupamento genotípico de <i>S. mutans</i> presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C4.....	81
Figura 23: Dendograma representativo do agrupamento genotípico de <i>S. mutans</i> presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C5.....	82
Figura 24: Dendograma representativo do agrupamento genotípico de <i>S. mutans</i> presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C7.....	83
Figura 25: Dendograma representativo do agrupamento genotípico de <i>S. mutans</i> presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C8.....	84
Figura 26: Dendograma representativo do agrupamento genotípico de <i>S. mutans</i> presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C9.....	86

Figura 27: Gráfico das médias dos números de genótipos obtidos por AP-PCR e mutacinótipos do grupo cárie-ativo.....	88
Figura 28: Gráfico das médias dos números de genótipos obtidos por AP-PCR e mutacinótipos do grupo livre de cárie.....	89

## LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E PALAVRAS EM OUTRO IDIOMA

AP-PCR	=	Reação de Polimerase em Cadeia com <i>Primers</i> Arbitrários
BLIS	=	Substância semelhante às Bacteriocinas (Bacteriocin-like Substances)
CPOD	=	Índice de Dentes Cariados, Perdidos e Obturados
dNTP(s)	=	Trifosfatos de desoxiribonucleotídeos
<i>et al.</i>	=	E outros (abreviatura de “ <i>et alii</i> ”)
FIG.	=	Figura
<i>fingerprinting</i>	=	Impressão Digital
g	=	Grama
<i>GTF</i>	=	Glicosiltransferase
<i>gtfB</i>	=	Glicosiltransferase B
G <sup>2</sup>	=	Teste Likelihood $\chi^2$ (Likelihood Ratio $\chi^2$ )
<i>In vitro</i>	=	Conjunto de reações que se realizam em tubos de ensaio ou em condições laboratoriais
<i>In vivo</i>	=	Experimento realizado em seres vivos
<i>lan</i>	=	<i>cluster</i> gênico de lantibióticos em geral
M	=	Molaridade (Molar)
MgCl <sub>2</sub>	=	Cloreto de Magnésio
mm	=	Milímetro
mM	=	Milimolar
mL	=	Mililitro

mV	=	Milivolts
n	=	Número de repetições por grupo
ng	=	nanograma
nM	=	nanomolar
ns	=	Não significativo
<i>cluster</i>	=	Grupo
°C	=	Grau Celsius
p	=	Nível de Significância ( $\alpha$ )
pb	=	Pares de Bases
pCO <sub>2</sub>	=	Pressão Parcial de CO <sub>2</sub>
pH	=	Potencial hidrogeniônico
<i>Primer</i>	=	Iniciadores
RAPD	=	Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso (Random Amplified Polymorphic DNA)
REA	=	Análise de Enzima de Restrição
Rf	=	Mobilidade Relativa
RFLP	=	Análise do Polimorfismo do Fragmento de Restrição
Score	=	Índice
S <sub>SM</sub>	=	Coefficiente de Similaridade
Swab	=	Dispositivo estéril similar ao “cotonete”
<i>Taq</i>	=	DNA polimerase isolada de <i>Thermus aquaticus</i>
<i>Polymerase</i>		
UFC	=	Unidades Formadoras de Colônias
UFC/mL	=	Unidades Formadoras de Colônias por mL
μ	=	micra
μg/mL	=	Microgramas por mililitro

## RESUMO

Os objetivos deste estudo foram: comparar a atividade de produção de mutacinas, a diversidade fenotípica/genotípica de *Streptococcus mutans* de voluntários cárie-ativos e livres de cárie, e determinar/comparar o grau de associação e a capacidade discriminatória da Mutacinotipagem a AP-PCR. Um total de 319 cepas de *S. mutans* isoladas a partir da saliva, placa dental e dorso de língua de 8 voluntários cárie-ativos e 8 livres de cárie foram submetidas à Mutacinotipagem à técnica de AP-PCR. O perfil mutacinogênico foi traçado pela Bacteriocinotipagem, utilizando-se 13 cepas indicadoras, entre elas: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. cricetus*, e o polimorfismo genético foi detectado através da técnica de AP-PCR com os *primers* OPA-02 e OPA-13. Cerca de 79,62% das cepas de *S. mutans* (254/319) analisadas produziram mutacinas contra pelo menos uma das 13 indicadoras. Através dos métodos de tipagem empregados, detectou-se que não houve relação entre a diversidade fenotípica e/ou genética de *S. mutans* e atividade de cárie. A Mutacinotipagem permitiu detectar 55 perfis fenotípicos contra 101 perfis genéticos polimórficos detectados pela AP-PCR, e foi limitada para a análise da heterogeneidade da espécie intra-indivíduo. O grau de associação entre as duas técnicas de agrupamento foi em média de 77,38%, sendo o poder discriminatório da AP-PCR (0,975) superior ao da Mutacinotipagem (0,925). Embora a Mutacinotipagem demonstre limitações para o estudo da diversidade fenotípica, através dela foi possível demonstrar que o potencial mutacinogênico, de *S. mutans* isolados de indivíduos com cárie, possuíram amplos espectros inibitórios contra as diferentes cepas indicadoras, já os isolados de voluntários livres de cárie apresentaram um perfil mais específico contra *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. mitis*, que são colonizadores predominantes nesta população. Teoricamente, inibindo seus competidores potenciais, os *S. mutans* teriam uma colonização bem sucedida, seja pela aquisição da hegemonia nutricional ou de receptores de superfície para sua adesão.

*Palavras-chave:* *Streptococcus mutans*, mutacinas, Mutacinotipagem, AP-PCR

## ABSTRACT

The objectives of this study were: to compare the activity of mutacin production, the fenotypic/genotypic diversity of *S. mutans* isolated from caries active and caries free individuals, and to evaluate the association index and the power discriminatory of Mutacin Typing and AP-PCR. In the present study, 319 strains of *S. mutans* isolated from saliva, dental plaque and tongue dorsum of 8 caries active and 8 caries free voluntareers were submitted to Mutacin Typing and AP-PCR. The mutacinogeny profile was traced, using 13 indicator strains between them: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. cricetus* and the genetic polymorphism was detected with *primers* OPA-02 and OPA-13. Mutacin was produced by 79,62% out of 319 isolates (245/319) inhibiting one or more of the 13 indicator strains. No corellation was found between the *S. mutans* fenotypic/genotypic diversity and caries activity, by the typing methods employed. The Mutacin typing allowed to evidence 55 distinct fenotypic patterns whereas AP-PCR detected 101 distinct patterns genotypic. The Mutacin Typing was limited to analyze *S. mutans* heterogeneity intra individually. The association index mean between Mutacin Typing and AP-PCR was 77,38%, and the discriminatory power of AP-PCR (0,975) was greater than the one Mutacin Typing (0,925). Bacteriocin Typing was limited to study for fenotypic diversity, however it was possible to demonstrate that *S. mutans* isolated from caries active group showed higher inhibitory activity than *S. mutans* isolated from caries free group, and the last presented highest antagonic effect against *S. sanguinis*, *S. oralis* and *S. mitis* (the predominant colonizers of this population). Theorically, inhibiting potencial competitors, *S. mutans* would have succesful colonization, either by nutricional or adhesion receptor aquisitions.

*Key-words:* *Streptococcus mutans*, mutacins, Mutacin Typing, AP-PCR

# 1. INTRODUÇÃO

A maioria dos *S. mutans* produz bacteriocinas (mutacinas) que são proteínas antibacterianas capazes de inibir o crescimento de bactérias genética e ecologicamente relacionadas (TAGG *et al.*, 1976), bem como o crescimento de outras espécies bacterianas Gram-positivas (QI *et al.*, 2001). O papel *in vivo* das mutacinas é desconhecido, porém sugere-se que cepas produtoras podem se beneficiar, ecologicamente, em ambientes de alta complexidade populacional, como a placa dental (BALAKRISHNAN *et al.*, 2002).

Teoricamente, a capacidade de produzir mutacinas, poderia favorecer a instalação e a colonização de estreptococos grupo mutans na complexa placa dental, aumentando assim o risco de cárie (GRÖNROOS *et al.*, 1998). Diante desta hipótese, o presente estudo, se propôs a analisar a atividade mutacinogênica de *S. mutans* isolados de populações de indivíduos com e sem cárie, através da Bacteriocinotipagem (ou Mutacinotipagem).

Este método fenotípico surgiu na década de 70, durante a corrida global científica em busca do rastreamento epidemiológico de estreptococos cariogênicos e permitiu agrupar cepas com perfis similares de produção e/ou sensibilidade às bacteriocinas, bem como tornou possível demonstrar a heterogeneidade intra-espécie e intra-indivíduo (KELSTRUP *et al.*, 1970). A partir do final da década de 80, métodos moleculares com maior capacidade discriminatória e confiabilidade aprimoraram os estudos epidemiológicos e foram comumente aplicados no estudo da diversidade genética de espécies bacterianas da cavidade bucal (CAUFIELD & WALKER, 1989; KULKARNI *et al.*, 1989; SAARELA *et al.*, 1993; GONÇALVES & MOUNTON, 1999).

Entre as técnicas moleculares, a AP-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com *Primers* Arbitrários), desenvolvida por WELSH & McCLELLAND (1990), foi amplamente utilizada na detecção da diversidade genotípica de patógenos orais (WILLIAMS *et al.*, 1990; CHEN & SLOTS, 1995). No presente trabalho, esta técnica foi comparada à Mutacinotipagem, tanto para a obtenção de resultados mais precisos acerca da tipagem e da diversidade fenotípica/genotípica de *S. mutans*, quanto para determinar e comparar o grau de associação e poder discriminatório das 2 técnicas.

A possível associação entre a biodiversidade de *S. mutans* e atividade de cárie merecem maiores esclarecimentos, visto que a escassa literatura revela dúvidas sobre o impacto da diversidade genética de espécies cariogênicas no desenvolvimento e progressão da cárie dental. 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 desenvolvimento de múltiplos genótipos, e a expressão de várias características fenotípicas de virulência, que podem aumentar, consideravelmente, o risco de cárie. Contestando este achado, KREULEN *et al.* (1997), sugeriram, a partir de seus resultados, que em crianças cárie-ativas, ocorre seleção clonal de *S. mutans* altamente patogênico.

Os estudos da biodiversidade de patógenos orais são importantes para a área da microbiologia oral, principalmente quando associados à análise dos fatores de virulência, visto que diferentes genótipos, em um mesmo indivíduo, variam na expressão de características que podem influenciar na sua patogenicidade e sobrevivência sob diferentes pressões ambientais (KÖHLER & KRASSE, 1990, CAUFIELD, 1997; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001b).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. ESTREPTOCOCOS GRUPO MUTANS e CÁRIE DENTAL

Os estreptococos grupo mutans são constituídos por 7 espécies de estreptococos, representados por 8 sorotipos, com características fenotípicas, ecológicas e patogênicas relacionadas com o desenvolvimento da cárie dental em humanos e em algumas espécies de animais (EMILSON & KRASSE, 1985; LOESCHE, 1986; BRATTHALL, 1991; BALAKRISHNAM *et al.*, 2002). As espécies deste grupo mais comumente relacionadas com o desenvolvimento da cárie dental em humanos são *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (LOESCHE, 1986; BALAKRISHNAM *et al.*, 2002).

A colonização e o acúmulo de estreptococos grupo mutans são influenciados por vários fatores na cavidade bucal, como condições nutricionais, componentes salivares e força de limpeza do fluxo salivar. A capacidade de sintetizar glucanos de aderência, insolúveis em água, através da sacarose e a produção de bacteriocinas também podem modificar o processo de infecção e a patogênese destas espécies (HAMADA & SLADE, 1980).

Segundo MARSH & MARTIN (1984), a cárie dental pode ser atribuída a um desequilíbrio da microbiota bucal. Dentre os numerosos fatores que afetam o equilíbrio ecológico da população de microrganismos orais, várias substâncias têm sido identificadas,

incluindo-se o peróxido de hidrogênio (DONOGHUE & TYLER, 1975), os ácidos (DONUGHUE & TYLER, 1975), os antibióticos (SANDERS & SANDERS, 1982) e as bacteriocinas (TAGG *et al.*, 1976).

## 2.2. CÁRIE DENTAL - OUTROS FATORES

A cárie dental é uma doença multifatorial. Embora, etiologicamente, a presença de estreptococos grupo mutans e lactobacilos sejam relevantes para o desenvolvimento e a progressão da doença, existem outros fatores importantes a serem considerados. Dentre os mais importantes, relatados na extensa literatura, estão: o período de aquisição de microrganismos cariogênicos, a composição e o processo de colonização da microbiota oral, a produção de mutacinas e a diversidade genética bacteriana.

### 2.2.1. PERÍODO DE AQUISIÇÃO

Segundo CATALANOTTO *et al.* (1975), a colonização primária de estreptococos grupo mutans depende da adesão microbiana em superfícies sólidas. Em vários estudos, a população de estreptococos cariogênicos não foi detectada em crianças edêntulas (BERKOWITZ *et al.*, 1975; CARLSSON *et al.*, 1975; ALALUUSUA, 1991).

Estudos realizados por CAUFIELD *et al.* (1991 e 1993) elucidaram o provável período de infectividade de espécies cariogênicas em crianças. O período ou “janela de infectividade” iniciava-se cerca de 12 meses após o início da emergência dos dentes decíduos (entre 19 e 31 meses de idade – média 26 meses).

Nesta faixa etária, tornam-se importantes as medidas preventivas para se evitar ou retardar a infecção por estreptococos grupo mutans, visto que crianças com histórico precoce de cárie dental tornam-se pacientes de alto risco (FUJIWARA *et al.*, 1991).

Achados anteriores à descoberta da “janela de infectividade”, mostram que a aquisição inicial de estreptococos grupo mutans pode ocorrer mais precocemente. BERKOWITZ & JONES (1985) demonstraram a transferência do mutacinótipo predominante nas mães às respectivas crianças com idades inferiores ao valor base da janela. No mesmo ano, BROWN *et al.* constataram que a alta carga infectiva proveniente das mães associada ao hábito da ingestão de uma dieta calórica rica em açúcares pode antecipar a “janela de infectividade” instituída por CAUFIELD *et al.* (1991 e 1993).

MATTOS-GRANER *et al.* (1998) avaliando a prevalência de estreptococos, em crianças brasileiras, com idades entre 12 e 19 meses, observaram que 70,8% das crianças analisadas foram infectadas por estreptococos grupo mutans, anteriormente ao período da “janela de infectividade” descrito por CAUFIELD *et al.* (1991 e 1993). Segundo ALALUUSUA (1991), o período de contaminação por microrganismos cariogênicos é influenciado pelas características epidemiológicas, sociais e culturais da população estudada.

A precocidade de aquisição de estreptococos grupo mutans também foi relatada por FLÓRIO *et al.* (2002), em um estudo longitudinal com crianças brasileiras saudáveis. Os resultados mostraram que 46% das 26 crianças analisadas apresentaram colonização persistente de estreptococos grupo mutans entre o 12<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> mês de vida (média 15,8<sup>o</sup> mês), período, significativamente ( $p < 0,05$ ), anterior à “janela de infectividade” relatada por CAUFIELD *et al.* (1991 e 1993).

#### 2.2.2. COLONIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO MICROBIANAS

Além dos constituintes da saliva, outros fatores ambientais, como a variação de pH, na cavidade bucal, podem modificar a composição e o perfil de colonização microbiana

neste ambiente. Estudos sobre colonização bacteriana em superfície de esmalte íntegro, revelaram que os primeiros colonizadores orais são constituídos por *Streptococcus sanguinis* e outros estreptococos grupo mitis (NYVAD & KILIAN, 1990). Além de participarem da colonização inicial, estes microrganismos podem se tornar predominantes de acordo com as condições ambientais. Uma condição favorável para a emergência de colonizadores primários é a manutenção de alto pH, na cavidade bucal. Quando ocorre a queda de pH, devido ao consumo de açúcares fermentáveis, o número de *S. sanguinis* diminui, ao passo que o número de *S. mutans* aumenta, consideravelmente, chegando ao predomínio populacional (van HOUTE, 1991).

Achados anteriores comprovaram, estatisticamente, a relação inversa entre o número de *S. mutans* e *S. sanguinis* (KEMP *et al.*, 1983; CAUFIELD *et al.*, 2000). A espécie *S. sanguinis* participa da microbiota indígena humana e é reconhecida por seu papel antagonista na cárie dental (LOESCHE *et al.*, 1975) e na doença periodontal (SOCRANSKY *et al.*, 1988). Devido ao reduzido potencial cariogênico de *S. sanguinis*, vários pesquisadores sugeriram que a proporção *S. mutans/S. sanguinis* pode ser utilizada como indicativo de risco de cárie (de STOPPELLAR *et al.*, 1969; LOESCHE *et al.*, 1975; LOESCHE & BHAT, 1976).

Segundo CARLSSON *et al.* (1970) a colonização de estreptococos grupo mutans é precedida pela colonização de *S. sanguinis*. Concordando com este estudo, CAUFIELD *et al.* (2000) demonstraram o provável período de infectividade de *S. sanguinis* em crianças (entre 8 e 11,2 meses – média 9 meses de vida), revelando que a alta afinidade aos receptores de superfície dental poderia priorizar sua colonização, em relação aos estreptococos grupo mutans.

De acordo com NIVAD & KILIAN (1990) indivíduos com cárie são mais propensos à colonização por estreptococos grupo mutans (em especial, *S. mutans*) diferenciando-se de indivíduos livres de cárie, que possuem uma colonização mais persistente de *S. sanguinis* e outros estreptococos grupo mitis.

### 2.2.3. PRODUÇÃO DE MUTACINAS

Vários fatores podem influenciar a relação inversa entre as espécies *S. mutans* e *S. sanguinis*, entre eles estão: a tolerância ao ácido, a compatibilidade com receptores específicos e a produção de mutacinas (NIVAD & KILIAN, 1990; QI *et al.*, 2001).

Em 2001, QI *et al.* detectaram uma cepa de *S. mutans*, UA140, capaz de produzir mutacina tipo I e IV, e sugeriram que a primeira (detectada em testes com meio sólido) seria sintetizada por células do biofilme, enquanto a segunda seria sintetizada por células planctônicas, uma vez que só foi detectada em cultura líquida (a classificação das mutacinas será explicada, detalhadamente, em capítulos subseqüentes). Diante destas afirmações, propuseram que os diferentes tipos de mutacinas podem contribuir em diferentes estágios no processo de colonização de *S. mutans*.

A mutacina IV, produzida por células planctônicas da saliva, seria importante na fase inicial do processo de colonização, eliminando os colonizadores primários, uma vez que seu espectro antimicrobiano demonstrou-se específico contra estas espécies. Assim, após o estabelecimento de *S. mutans* na superfície dental, iniciar-se-ia a síntese de mutacina tipo I por células constituintes do biofilme, que agiria na inibição de competidores potenciais de diversas espécies.

Teoricamente, a grande produção de mutacinas por estreptococos grupo mutans poderia aumentar o nível destas bactérias na placa dental, aumentando também o risco de

cárie (GRÖNROOS *et al.*, 1998). Entretanto, ALALUUSUA *et al.* (1991), não encontraram relação entre a atividade mutacinogênica e o risco de cárie (contagem de *S. mutans* na placa). Em contrapartida, FABIO *et al.* (1987), observaram diferenças na proporção de estreptococos grupo mutans sobre o total de estreptococos orais em relação à síntese de mutacinas. As amostras de placa bacteriana que apresentaram maior proporção de estreptococos grupo mutans também apresentaram cepas deste grupo com maior potencial mutacinogênico.

#### 2.2.4. DIVERSIDADE GENÉTICA

ALALUUSUA *et al.* (1996), avaliaram a diversidade genética de estreptococos do grupo mutans isolados de seis crianças livres de cárie e seis crianças com cárie de mamadeira, através da análise do padrão de restrição do DNA ribossômico (ribotipagem). Quatro crianças cárie ativas e 1 livre de cárie apresentaram mais de um ribotipo, demonstrando que indivíduos com maior atividade de cárie apresentaram maior diversidade genética de estreptococos cariogênicos. Segundo estes autores, a colonização de múltiplos genótipos é uma consequência da frequência de consumo de líquidos contendo carboidratos fermentáveis, como a sacarose, o que torna o ambiente propício para o crescimento de espécies cariogênicas. Provavelmente, a ação simultânea de várias cepas, com diferentes potenciais cariogênicos aumentaria o risco de cárie (ALALUUSUA *et al.*, 1996).

Em contrapartida, achados de KREULEN *et al.* (1997), sugeriram que genótipos específicos de *S. mutans* são selecionados em crianças com alta atividade de cárie. Neste estudo, avaliou-se a diversidade genética de *S. mutans* isolados de amostras de placa dental associada ou não à cárie e de amostras de saliva. O polimorfismo genético foi avaliado através de reação em cadeia de polimerase com *primers* ou iniciadores arbitrários (AP-

PCR). Todas as crianças cárie ativas apresentaram apenas um padrão genético de *S. mutans*, e as de baixa atividade de cárie apresentaram de 2 a 5 genótipos distintos. A seleção clonal da cepa de *S. mutans* mais virulenta, em crianças de alto risco de cárie, poderia ocorrer durante a alteração da homeostase, possivelmente devido à redução de pH, na cavidade bucal. Os autores ainda sugerem que sendo o processo cariogênico desenvolvido por um único tipo de cepa, futuramente, poder-se-ia desenvolver uma terapia antimicrobiana específica bem sucedida.

Pouca informação existe sobre o impacto da diversidade clonal de estreptococos grupo *mutans* na severidade da cárie dental (BOWDEN, 1997), sendo este um campo promissor para o melhor entendimento dos processos de colonização e indução de cárie dental por estes microrganismos.

### 2.3. BACTERIOCINAS – DEFINIÇÃO

Bacteriocinas são substâncias antibacterianas que algumas bactérias produzem para inibir o crescimento de outras genética e ecologicamente relacionadas (JACOB *et al.*, 1953; TAGG *et al.*, 1976). Estas substâncias podem agir contra outras espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (KELSTRUP & GIBBONS, 1969b; HAMADA & OOSHIMA, 1975a; ROGERS, 1976; QI *et al.*, 2001), bem como conferir vantagens ecológicas em diversas comunidades bacterianas, como na placa dental (BALAKRISHNAM *et al.*, 2002).

Segundo HAMADA & OOSHIMA (1975a), a placa dental é constituída por uma comunidade de diversas espécies de microrganismos, entre eles os *S. mutans*. A capacidade em produzir mutacinas pode conferir vantagens à cepa produtora sobre as demais bactérias

presentes nas lesões de cárie. O antagonismo, provavelmente, ocorre na superfície dental e pode ser importante para a estabilidade de *S. mutans in situ*.

A produção de bacteriocinas por bactérias Gram-positivas está geralmente associada à passagem da fase *log* para a fase estacionária do crescimento bacteriano (BUCHMAN *et al.*, 1988), e à densidade celular no meio de cultura (RILEY & WERTZ, 2002). Tais afirmações *in vitro* podem sugerir intensa atividade bacteriocinogênica na placa dental, onde a alta complexidade e densidade celular, bem como as restrições alimentares elevam a competitividade entre as bactérias.

#### 2.4. MUTACINAS

Uma característica marcante dos estreptococos grupo mutans é alta frequência da produção de bacteriocinas (denominadas mutacinas) ou substâncias semelhantes às bacteriocinas (BLIS). O termo BLIS foi adotado como referência para bacteriocinas ou moléculas inibitórias não caracterizadas (BALAKRISHNAM *et al.*, 2002).

Dentre os principais estreptococos orais, a produção de bacteriocinas ou de substâncias semelhantes a elas foi relatada em *Streptococcus sanguinis* (SHLEGEL & SLADE, 1972; PAUL & SLADE 1975; ITO, 1982), em *S. mutans* (PAUL & SLADE, 1975; IKEDA *et al.*, 1982; HILLMAN *et al.*, 1984; HAMADA *et al.*, 1986), *S. mitis* (APELGREN & DAJANI, 1979) e *S. salivarius* (DEMPSTER & TAGG, 1982; SANDERS & SANDERS, 1982).

A bacteriocinogênese poderia influenciar na implantação de estreptococos grupo mutans, por substituição da microbiota indígena ou por prevenir a invasão de bactérias exógenas (van der HOEVEN & ROGERS, 1979; ROGERS *et al.*, 1979; IKEDA *et al.*, 1982; HILLMAN *et al.*, 1984).

#### 2.4.1. PRODUÇÃO E PROPRIEDADES DAS MUTACINAS

A frequência de produção de mutacinas por *S. mutans* pode variar de 70 a 100% (BERKOWITZ & JORDAN, 1975 - 99,1%; HAMADA & OOSHIMA, 1975a - 75%; ROGERS, 1976 - 70%; BERKOWITZ & JONES, 1985 - 100%; GRÖNROOS *et al.*, 1998 - 88%). e os diferentes valores da frequência de produção detectados, devem-se, provavelmente, ao uso de diferentes cepas indicadoras e às diferenças nas condições de realização dos testes (ROGERS, 1976).

Segundo ROGERS (1976), a alta incidência da bacteriocinogênese em *S. mutans* favorece a utilização desta técnica para a tipagem fenotípica desta espécie.

KELSTRUP & GIBBONS (1969a), detectaram 5 cepas mutacinogênicas, dentre 13 estreptococos orais analisados, que inibiram o crescimento de bactérias não relacionadas como: *Streptococcus pyogenes* e enterococos, mas não foram ativas contra espécies de *Lactobacillus sp*, *Staphylococcus salivarius* e *Escherichia coli*. Em estudos subseqüentes, KELSTRUP *et al.* (1970), descreveram algumas cepas de *S. mutans* produtoras de bacteriocinas contra várias espécies de estreptococos. Anos mais tarde, ROGERS (1972) relatou a existência de várias cepas de *S. mutans* com atividade mutacinogênica contra *Streptococcus pyogenes* grupo A.

Em 1975a, HAMADA & OOSHIMA relataram numerosas espécies de bactérias Gram-positivas, incluindo micobactérias, estreptomicetos e actinomicetos sensíveis à atividade inibitória das mutacinas produzidas por cepas de *S. mutans*.

A composição do meio de cultura pode influenciar na sensibilidade e na produção de bacteriocinas. HAMADA & OOSHIMA (1975b) verificaram que cepas indicadoras, cultivadas em meio de cultura líquido enriquecido com sacarose (5%), apresentavam maior

sensibilidade às mutacinas. Subseqüentemente, ROGERS (1976), utilizando 2 tipos de meio de cultura (TSA e BHI ágar), na Mutacinotipagemde *S. mutans*, detectou padrões mutacinogênicos distintos para o mesmo isolado. Através dessas observações, o autor sugeriu que mais de tipo de mutacina poderia ser sintetizada por uma mesma cepa de *S. mutans*. Diferenças nas dimensões das zonas de inibição também podem ser atribuídas à taxa de difusão da substância no meio de cultura e à concentração de ágar (PARROT *et al.*, 1989).

Para HAMADA & OOSHIMA (1975b), as mutacinas geralmente são estáveis ao calor e podem ser destruídas por enzimas proteolíticas ou lipolíticas, embora, no seu estudo, a inativação da atividade mutacinogênica, pela protease, extraída da placa dental, e a catalase não foi observada.

#### 2.4.2. MUTACINAS – INTERAÇÃO ECOLÓGICA E CÁRIE DENTAL

Os mecanismos das mutacinas, na regulação ecológica da microbiota oral, ainda são desconhecidos. Para ROGERS (1974) o papel *in vivo* exercido pelas mutacinas seria limitado, pois num mesmo nicho da cavidade bucal, foram isoladas cepas de *S. mutans* produtoras e sensíveis.

A saliva parece não afetar a atividade inibitória de bacteriocinas, pois vários estudos *in vivo* relataram o maior sucesso de colonização de cepas altamente mutacinogênicas, na cavidade bucal de ratos e de humanos (van der HOEVEN & ROGERS, 1979; ROGERS *et al.*, 1979; HILLMAN *et al.*, 1987), além disso, vários estudos *in vitro*, com enzimas salivares (HAMADA & OOSHIMA, 1975b; FUKUSHIMA *et al.*, 1985; DELISLE, 1986) não comprovaram a inativação enzimática da atividade bacteriocinogênica.

Segundo PARROT *et al.* (1989) a inativação enzimática das bacteriocinas, na cavidade bucal, torna-se limitada devido à baixa concentração de substâncias proteolíticas, neste ambiente. Entretanto o papel das bacteriocinas num ambiente altamente competitivo e restrito, como o encontrado na placa dental, é totalmente desconhecido.

GRÖNROOS *et al.* (1998) afirmaram que, em virtude de suas propriedades biológicas de antagonismo seletivo, as bacteriocinas possuem papel preponderante no processo de colonização e consolidação de uma cepa pioneira, e que cepas altamente produtoras dessas substâncias são mais facilmente transmitidas em relação às cepas com baixo potencial mutacinogênico. Talvez esse componente possa influenciar na estabilidade e na prevalência de estreptococos grupo mutans na cavidade bucal, contribuindo com a patogenicidade destes microrganismos (ALALUUSUA *et al.*, 1991).

Alguns pesquisadores suportaram a idéia do emprego das bacteriocinas no controle e prevenção da cárie dental (IKEDA *et al.*, 1982; HILLMAN *et al.*, 1984, 1987 e 2000).

Em 1985, HILLMAN *et al.* observaram a colonização persistente de *S. mutans* JH1001, uma cepa com alto espectro inibitório, na cavidade bucal de humanos, após quatro ou mais exposições à mesma. Este experimento demonstrou uma correlação positiva entre o potencial de infecção e os níveis de produção de bacteriocinas *in vitro*. Estudos subseqüentes procuraram aplicar esta cepa efetora, após a construção de um mutante JH1005, deficiente na síntese de ácidos e com amplo espectro de inibição bacteriana, na terapia de substituição e redução da cárie dental. Esta cepa efetora, teoricamente agiria no controle populacional de cepas mais cariogênicas (HILLMAN *et al.*, 1987).

Muitos experimentos, em humanos, deverão ser realizados para que se possa fundamentar a hipótese da terapia de substituição, como altamente segura e eficaz na prevenção da cárie dental (HILLMAN *et al.*, 2000).

#### 2.4.3. CLASSIFICAÇÃO DAS MUTACINAS

KELSTRUP & GIBBONS (1969a), inicialmente sugeriram que as bacteriocinas de estreptococos podem ser diferenciadas baseando-se no espectro de ação inibitório, na morfologia da zona de inibição e na sensibilidade ao clorofórmio e várias enzimas. KELSTRUP & FUNDER-NIELSEN (1977), dividiram as bacteriocinas de *S. mutans* em dois grupos de acordo com a massa molecular e a sensibilidade ao calor. O primeiro grupo foi inativado com aquecimento a 80°C por 20 min e possuía massa molecular > 10.000 Da, o segundo grupo era constituído por moléculas pequenas (< 10.000 Da) e estáveis ao calor. Porém o espectro de atividade, a sensibilidade ao éter, ao clorofórmio e a tripsina variavam, consideravelmente, dentro de um mesmo grupo.

Anos mais tarde, HAMADA & OOSHIMA (1975b), baseando-se em propriedades físico-químicas e na sensibilidade a diferentes enzimas, propuseram a existência de pelo menos 2 grupos de mutacinas, sensível ou resistente à ação de proteases e lipases. Através destes resultados, e analisando a capacidade de difusão das mutacinas, em papel celofane, os autores concluíram que as mutacinas podem ser representadas por uma variedade de proteínas de baixo peso molecular ou de polipeptídeos de grande peso molecular associados ou não a lipídeos e/ou polissacarídeos.

Subseqüentemente, CAUFIELD *et al.* (1985 e 1986) classificaram *S. mutans* produtores de mutacinas em 2 grupos, baseando-se no espectro de inibição e na imunidade específica das cepas mutacinogênicas às suas bacteriocinas homólogas. Verificaram

também que as cepas do grupo II produziam mutacina II, em meio líquido (TSB enriquecido com 2% de extrato de levedura), diferentemente das cepas do grupo I.

BONDI *et al.* (1991), dividiram 49 cepas produtoras de mutacinas em 5 grupos, de acordo com a atividade inibitória contra 9 estreptococos orais e com a sensibilidade das mutacinas ao calor, ao clorofórmio, e às proteases. As mutacinas produzidas pelas cepas do tipo II e V foram sensíveis ao calor (80°C por 20 min) e ao clorofórmio, diferentemente das mutacinas produzidas por cepas dos grupos III e IV. Somente as mutacinas sintetizadas por cepas dos grupos III e V foram sensíveis às proteases.

Finalmente, MORENCY *et al.* (1995) demonstraram, fenotipicamente, a diversidade dos peptídeos antimicrobianos sintetizados por *S. mutans*, classificando 86 cepas mutacinogênicas em 24 grupos distintos (A - X), através do espectro de atividade contra 12 estreptococos orais e da sensibilidade a outras cepas produtoras de mutacinas.

Através das técnicas de purificação e seqüenciamento, a mutacina I (QI *et al.*, 2000) e a mutacina II (NOVÁK *et al.*, 1994), previamente identificadas por CAUFIELD *et al.* (1985 e 1986) foram classificadas como lantibióticos (uma classe de bacteriocinas com resíduos de lantionina ou  $\beta$ -metil-lantionina). Recentemente, QI *et al.* (1999) identificaram a mutacina III da cepa *S. mutans* UA787 e relataram a existência de uma única cepa de *S. mutans* (UA140) capaz de sintetizar a mutacina I (lantibiótico) e a mutacina IV (não lantibiótico) (QI *et al.*, 2001).

Em 2002, ALI *et al.* compararam o agrupamento fenotípico, previamente realizado por MORENCY *et al.* (1995), com a análise genotípica baseada nas seqüências de genes que codificam pré-peptídeos de mutacinas descritas, previamente. As seqüências de

aminoácidos de 4 mutacinas (B-Ny266/1140/mutacina III e mutacina II) foram utilizadas na construção de “*primers*” específicos de DNA para detecção de genes similares em cepas de *S. mutans*, fenotipicamente classificadas em 24 grupos de A a X (MORENCY *et al.*, 1995).

As cepas dos grupos A, B e T hibridizaram positivamente com o primeiro “*primer*” desenvolvido, demonstrando similaridade ou homologia, nas estruturas primárias dos peptídeos, porém, fenotipicamente, esses antimicrobianos demonstraram-se distintos. A diferença no padrão de produção de antimicrobianos homólogos, deve-se em parte, a difusão diferenciada das substâncias no meio de cultura (de VOS *et al.*, 1993). Por exemplo a Nisina A e sua bacteriocina homóloga, Nisina Z, produzidas por *Lactococcus lactis*, diferem em um único aminoácido, mas os espectros de atividade têm somente 83% de similaridade (MORENCY *et al.*, 2001).

Já os grupos J, G e H apresentaram genes similares ao da mutacina II, e alta similaridade fenotípica entre eles ( $\geq 90\%$ ). Somente 6 das 24 cepas de *S. mutans* testadas por ALI *et al.* (2002), eram portadoras de genes similares às mutacinas já descritas, confirmando, genotipicamente, a grande diversidade de mutacinas existentes, ainda não exploradas. As diferenças nas seqüências dos genes das mutacinas sugerem divergências de um ancestral comum (ALI *et al.*, 2002), porém, a transferência horizontal de genes de outras espécies, através de *transposons* móveis, não deve ser descartada.

BALAKRISHNAN *et al.* (2002) classificaram 16 cepas de *S. mutans* produtoras de mutacinas em 4 grupos (A-D). A classificação baseou-se na atividade inibitória entre as cepas produtoras de bacteriocinas homólogas (para testar a presença de imunidade-própria)

e contra cepas indicadoras representadas por *Staphylococcus aureus* 46 e *Enterococcus faecium* TE1. As cepas do grupo B diferenciaram-se das cepas do grupo A, pela atividade inibitória contra *Enterococcus faecium* TE1, enquanto que as cepas do grupo C e D foram ativas contra *Staphylococcus aureus* 46 e *Enterococcus faecium* TE1. O grupo D diferenciou-se do grupo C por não apresentar imunidade à própria bacteriocina e às bacteriocinas homólogas. As cepas *S. mutans* UA140 e UA96 representativas dos grupos de produtoras de mutacina I e II, respectivamente, descritos previamente por CAUFIELD *et al.* (1985 e 1986), foram incluídas nos testes da bacteriocinotipagem, como cepas de perfil padrão. As cepas identificadas do grupo A e B apresentaram perfil fenotípico semelhante as do grupo I e II, respectivamente. A análise filogenética de cepas de *S. mutans* através de características genotípicas (*Multilocus enzyme eletrophoresis*) e fenotípicas (hidrólise da esculina, fermentação da amigdalina e o teste da  $\beta$ -hemolisina) revelaram que os grupos de mutacinas estão associados com linhagens evolucionárias distintas da espécie (BALAKRISHNAN *et al.*, 2002).

Todas as cepas analisadas dos grupos B e C foram, filogeneticamente, da mesma linhagem, porém cepas do grupo D foram agrupadas com duas cepas não produtoras de mutacinas e duas do grupo A não foram, geneticamente, relacionadas.

A dificuldade em classificar as mutacinas através de seu espectro de atividade e imunidade, deve-se em parte ao emprego de sobrenadantes de cultura, na bacteriocinotipagem, ao invés de substâncias previamente purificadas. Resultados restritos e contrastantes podem ser obtidos, dificultando as análises comparativas de síntese de

mutacinas, uma vez que uma única cepa pode produzir mais de um tipo de substância inibitória (VINCENT *et al.*, 1998).

## 2.5. GENÉTICA DE BACTERIOCINAS

Inicialmente, CAUFIELD *et al.* (1985 e 1986) propuseram que os plasmídeos 5.6-kb, presentes em cepas produtoras de mutacinas I e II, fossem responsáveis pela produção das mesmas. Porém, anos mais tarde, CAUFIELD *et al.* (1990 a, b), propuseram que a produção das mutacinas I e II era codificada, cromossomicamente. Evidências da localização cromossomal dos genes que codificam a mutacina foram comprovadas através de estudos de inserção de *transposon* Tn916 no cromossomo de uma cepa mutante, derivada do *S. mutans* UA96 (CAUFIELD *et al.*, 1990 b). As localizações cromossomais de genes estruturais das mutacinas I (QI *et al.*, 2000), II (WOODRUFF *et al.*, 1998) e III (QI *et al.*, 1999) foram confirmadas através da clonagem e do seqüenciamento. Recentemente, QI *et al.* (2001) relataram que os dois componentes da mutacina IV, produzida pela cepa UA140, são codificados pelos genes *nImA* e *nImB*, localizados no DNA cromossômico.

As bacteriocinas são sintetizadas por ribossomos como peptídeos precursores, com um peptídeo sinal, na porção N-terminal, típica de proteínas secretadas (NES *et al.*, 1996), o qual é clivado, concomitantemente, com a exportação do peptídeo maduro através da membrana (HAVARSTEIN *et al.*, 1995).

Baseando-se na modificação pós-tradução, as bacteriocinas de bactérias Gram-positivas foram classificadas em 2 grupos: classe I, de bacteriocinas modificadas ou lantibióticos, e classe II, de bacteriocinas não modificadas ou não lantibióticos.

Os não lantibióticos são subdivididos em 2 grupos (NISSEN-MEYER & NES, 1997): a classe IIa, representada por bacteriocinas semelhantes à pediocina AcH e PA-1 de

*Pediococcus* sp (ENNAHAR *et al.*, 1996; HENDERSON *et al.*, 1992) e ativas contra *Listeria* sp (VINCENT *et al.*, 1998), e classe IIb, representada pelas bacteriocinas de dois peptídeos sinérgicos como as lactococinas G, plantaricina E/F, lactacina F, termofilina 13 e mutacina IV (ANDERSSSEN *et al.*, 1998; FREMAUX *et al.*, 1993; MARCISET *et al.*, 1997; MOLL *et al.*, 1998; QI *et al.*, 2001).

Já os lantibióticos são peptídeos pequenos que contêm lantionina,  $\beta$ -metil-lantionina e resíduos desidratados, produzidos por bactérias Gram-positivas (JUNG, 1991; SAHL *et al.*, 1995). Os lantibióticos são sintetizados por ribossomos e sofrem modificações após a tradução (SCHELL *et al.*, 1988). Os genes de biossíntese dos lantibióticos estão organizados em clusters gênicos que expressam pré-peptídeos antibióticos, enzimas de modificação e proteínas acessórias como proteases, transportadores ABC, proteínas regulatórias e de imunidade (SAHL & BIERBAUM, 1998). A comparação dos clusters de genes dos lantibióticos demonstra boa conservação gênica (FIG.1), o que provavelmente se explica pela similaridade de suas funções, como a biossíntese do peptídeo precursor (codificado por *lanA*), modificação do pré-peptídeo através de desidratação e formação de anéis de tioéter (*lanB* e *C* ou *M*), processamento do pré-peptídeo, que geralmente ocorre intracelularmente por ação de uma protease serina (*lanP*), translocação do pré-peptídeo ou do peptídeo maduro (*lanT*), imunidade (*lanF*, *E*, e *G* e/ou *lanI*, sendo o último um gene pouco conservado), e regulação identificados em alguns lantibióticos (*lanR* e *K*) (SIEZEN *et al.*, 1996).

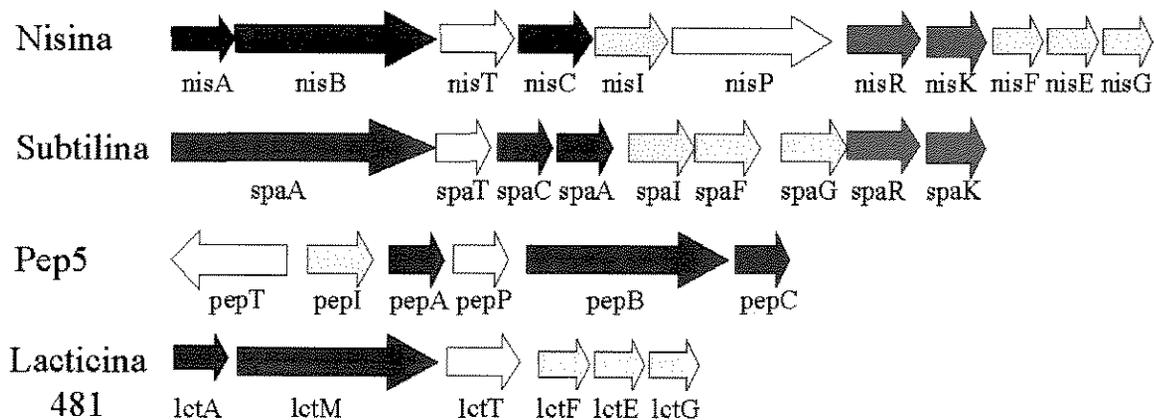


Figura 1 - Organização dos clusters de genes de biossíntese de lantibióticos bem caracterizados em diferentes espécies de bactérias Gram-positivas. Genes com funções similares apresentam as mesmas cores (azul de produção de peptídeo precursor, vermelho de modificação, branco de transporte/processamento, amarelo de imunidade, verde de regulação) (de VOS *et al.*, 1995).

Baseando-se nas estruturas secundárias e no modo de ação das bacteriocinas de diferentes espécies de bactérias Gram-positivas, JUNG (1991) classificou os lantibióticos em duas classes, tipo A (lineares e formadores de poros na membrana da célula alvo) e tipo B (globulares e inibidores de enzimas). de VOS *et al.* (1995) e SAHL & BIERBAUM (1998) dividiram os lantibióticos tipo A em subgrupos de acordo com a seqüência dos seus peptídeos primários. O subgrupo AI contém lantibióticos semelhantes a nisina (*Lactococcus lactis*), como subtilina (*Bacillus subtilis*), epidermina (*Staphylococcus epidermidis*), pep5 (*Pediococcus* sp) e mutacina I e III (*Streptococcus mutans*) (ALLGAIER *et al.*, 1986; GROSS & MOREL, 1971; KALETTA *et al.*, 1989; WEIL *et al.*, 1990; DUFOUR *et al.*, 2000; QI *et al.*, 2000;), e o subgrupo AII constituído pela lacticina 481, estreptococina A-FF22, salivaricina, variacina e mutacina II (HYNES *et al.*, 1993; PRIDMORE *et al.*, 1996; ROSS *et al.*, 1993; QI *et al.*, 2000). Embora, a mutacina II seja linear, sua atividade funcional é similar aos lantibióticos tipo B - globulares e inibidores de enzimas (ALI *et al.*, 2002).

Os clusters de genes de biossíntese dos lantibióticos (de VOS *et al.*, 1995; JACK *et al.*, 1995; NES & TAGG, 1996; QI *et al.*, 2000) podem ser encontrados em plasmídeos (epidermina, pep5, citolisina, lacocina S e estreptococina S), em *transposons* conjugativos (nisina e lacticina 481), ou em cromossomos (subtilina, epilancina K7, salivaricina A, variacina e mutacinas I, II, III e IV). BUCHMAN *et al.*, (1988) sugeriram que muitos, se não todos os lantibióticos provavelmente evoluíram de um ancestral comum, e a capacidade de produzi-los se tornou dispersa entre as bactérias Gram-positivas, pela transferência de elementos genéticos móveis como plasmídeos e *transposons*.

A presença de um gene silencioso codificando uma transposase (*tra*) anterior à região dos genes de síntese da mutacina II (CHEN *et al.*, 1999), sugere que a capacidade de *S. mutans* T8 em produzi-la pode ter sido obtida de um *transposon* ancestral, que uma vez estável no cromossomo hospedeiro, tornou-se não funcional. McLAUGHLIN *et al.*, 1999, também observaram genes de transposase próximo ao operon da estreptococina de *S. pyogenes* A-FF22 com seqüência similar ao *transposon* de lactococos, sugerindo transferência de genes entre as duas espécies.

Bactérias bacteriocinogênicas devem apresentar imunidade à sua própria ação antimicrobiana. Este mecanismo de imunidade a um antimicrobiano natural é, especialmente importante se a bacteriocina produzida não necessitar de um receptor específico para sua atividade, como é o caso dos lantibióticos lineares do tipo A. Esses lantibióticos formam poros voltagem-dependentes na membrana citoplasmática de células alvos, sendo letais também para as próprias células produtoras (SARIS *et al.*, 1996).

A imunidade à nisina e subtilina está baseada na expressão de *lanFEG* que codifica proteínas de um cassete de transporte ATP-dependente, denominadas de ABC-

transportadoras (ATP Binding Cassette) (KUIPERS *et al.*, 1993; ENGELKE *et al.*, 1994) e *lanI* que codifica lipoproteínas de imunidade, não associadas, de vários tamanhos (SARIS *et al.*, 1996). Já no cluster da epidermina (PESCHEL & GÖTZ, 1996) e da mersadina (ALTENA *et al.*, 2000) foram encontrados somente genes de imunidade que codificam proteínas transportadoras. Ao contrário, somente *lanI* foi encontrado nos clusters da Pep5 (PAG *et al.*, 1999), epidicina (HEIDRICH *et al.*, 1998) e lactococina S (SKAUGEN *et al.*, 1997).

No cluster das mutacinas I, II e III de *S. mutans*, genes *lanI* estão ausentes, implicando em maior necessidade dos transportadores de imunidade LanFEG, nesta espécie (Gene Bank, AF238860; AF082183; AF154675, respectivamente). O mecanismo com que estas proteínas conferem imunidade aos *S. mutans*, portadores destes genes, ainda é desconhecido. A inibição do efeito dos lantibióticos formadores de poros pode ser realizada através da translocação de bacteriocinas adsorvidas na membrana para o meio interno, onde, posteriormente sofreria degradação protéica ou através da translocação para o meio extracelular (SARIS *et al.*, 1996). Embora o processo de imunidade seja específico (SARIS *et al.*, 1996), reações de imunidade cruzada têm sido observadas entre cepas produtoras de variantes naturais, como a nisina A e Z, produzidas por *Lactococcus lactis* (de VOS *et al.*, 1993), ou epidermina e galidermina, produzidas respectivamente por *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus gallinarium* (SARIS *et al.*, 1996).

A expressão de peptídeos de imunidade geralmente está acoplada à produção da bacteriocina correspondente (SARIS *et al.*, 1996). STEIN *et al.* (2003) foram capazes de promover a expressão de genes de imunidade à nisina, em células de *Bacillus subtilis* sensíveis, através da integração de diferentes combinações dos genes *nisI* e *nisFEG*,

heterólogos de *Lactococcus lactis*. Observou-se que o nível de tolerância à nisina adquirido pelo mutante de *Bacillus subtilis* foi de apenas 30%, em relação ao nível de imunidade de uma cepa de *Lactococcus lactis*, produtora de nisina, sugerindo que a expressão induzida dos genes de imunidade na célula receptora é bem diferente do sistema auto-regulatório presente em cepas produtoras do respectivo lantibiótico.

Assim como a produção de bacteriocinas pode influenciar na estabilidade de determinada espécie em seu nicho ecológico, a imunidade a diferentes antimicrobianos naturais também pode ter importante papel na hegemonia e na sucessão microbiana.

A cepa de *S. mutans* UA159, cujo genoma foi, recentemente, seqüenciado (AJDIC *et al.*, 2002), embora não produza bacteriocinas, apresentou genes homólogos aos genes de imunidade (*lanFEG*) dos clusters dos genes da estreptococina de *Streptococcus pyogenes* A-FF22 e da lacticina de *Lactococcus lactis* 481 (DUFOUR *et al.*, 2000). Embora esses genes de imunidade possam representar fragmentos de um cluster gênico de bacteriocina, sugere-se que os genes retidos de imunidade possam promover proteção às substâncias antimicrobianas sintetizadas por outras espécies, geneticamente semelhantes (AJDIC *et al.*, 2002).

Diante das observações supracitadas pode-se sugerir que a expressão de genes de imunidade adquiridos, vertical ou horizontalmente, pode ser importante no processo competitivo de colonização e estabilização de microrganismos, em seu habitat.

## 2.6. BACTERIOCINOTIPAGEM & MUTACINOTIPAGEM

Após a descoberta do envolvimento direto de estreptococos no desenvolvimento da cárie dental humana (FITZGERALD & KEYES, 1960; KEYES, 1960), iniciou-se uma

corrida científica global em busca da elucidação do processo de transmissibilidade e da epidemiologia dos principais microrganismos cariogênicos.

Vários estudiosos empenharam-se na descoberta de possíveis rotas de transmissão de *S. mutans*, o principal agente etiológico da cárie dental, no intuito de controlar a doença. Os primeiros estudos buscaram a classificação dos estreptococos grupo mutans em sub-grupos relacionados, antigenicamente (BRATTHALL, 1970). Utilizando a sorotipagem, KÖHLER & BRATTHALL (1978) demonstraram que a transmissão de estreptococos grupo mutans para as crianças era proveniente de um dos pais ou responsável pela mesma, na maior parte do tempo. Os adultos, responsáveis pela transmissão de bactérias através da saliva e fômites, eram portadores de um grande número de estreptococos de determinado sorotipo na saliva. Em 1980, HAMADA *et al.* comprovaram que um mesmo sorotipo poderia ocorrer, simultaneamente, em pares mãe-filho(a) e que a transmissão poderia ser veiculada, repetidamente, pela saliva.

Sabe-se, atualmente, que sub-grupos antigenicamente relacionados podem corresponder a diferentes espécies. DAVEY & ROGERS, em 1984, relataram que a sorotipagem de estreptococos grupo mutans é insatisfatória para fins epidemiológicos, principalmente porque o *S. mutans* sorotipo c, é o mais freqüentemente isolado em crianças e adultos, no Ocidente. A partir das limitações de classificação de estreptococos grupo mutans através da sorotipagem, vários grupos (BERKOWITZ & JORDAN, 1975; ROGERS, 1981; DAVEY & ROGERS, 1984) passaram a empregar técnicas com maior poder discriminativo infraespecífico, como a bacteriocinotipagem, no rastreamento epidemiológico de estreptococos grupo mutans.

A bacteriocinotipagem baseia-se no padrão de produção de bacteriocinas frente a um conjunto de cepas indicadoras, bem como no perfil de sensibilidade as diferentes substâncias inibitórias (KELSTRUP *et al.*, 1970; ROGERS, 1975; ROGERS, 1976).

A maioria das cepas de *S. mutans* produzem mutacinas, em meio sólido, e estudos prévios demonstraram que as zonas de inibição observadas no ágar não estão associadas a presença de bacteriófagos ou a produção de ácidos (BERKOWITZ & JONES, 1985; PARROT *et al.*, 1989).

Segundo PARROT *et al.* (1989), a redução de pH devido à produção de ácido láctico e a concentração do mesmo na zona de inibição (de 17 a 20 mM) não são suficientes para inibir o crescimento de cepas indicadoras. Utilizando o *Spot test*, uma concentração de 400 mM, em média, de ácido láctico não neutralizado, foram necessários para inibir o crescimento de *Streptococcus sanguinis* NY101 (cepa pouco acidúrica). WEERKAMP *et al.* (1977), também demonstraram que somente uma concentração de 800 mM de ácido láctico (pH 4,2) e 1,8 M (pH 6,0) foram capazes de inibir o crescimento da cepa *S. sanguinis* NY101 (tais dados contraditórios deve-se às diferenças de pH e concentração de ácidos em toda a extensão da zona de inibição, que tendem a ser maiores ao redor das colônias).

A bacteriocinotipagem de estreptococos grupo mutans é denominada mutacinotipagem e, segundo ARBEIT, 1999, a técnica possui os critérios básicos de tipagem de microrganismos como: tipeabilidade (capacidade de classificar os isolados), reprodutibilidade (capacidade de se obter os mesmos resultados em análises repetidas) e discriminação (capacidade de diferenciação de cepas não relacionadas). Utilizando este

método fenotípico, KELSTRUP *et al.* (1970) demonstraram a heterogeneidade e a diversidade de estreptococos grupo mutans em um mesmo indivíduo.

Anos depois, BERKOWITZ & JORDAN (1975), verificaram que o padrão de produção de mutacinas analisado em 120 cepas *S. mutans* eram semelhantes entre 4 pares de mãe-filho(a), sugerindo a transmissão maternal (vertical) desta espécie. Em 1981, ROGERS relatou, que 88% das famílias analisadas no estudo, dois ou mais membros, sendo que pelo menos um era representado por um dos pais, compartilhavam de cepas *S. mutans* com o mesmo padrão fenotípico.

A comparação de biótipos de *S. mutans* entre diferentes indivíduos permitiu a identificação das mães como a principal fonte de infecção desta espécie (BERKOWITZ & JORDAN, 1975; DAVEY & ROGERS, 1984), embora nem todos os bacteriocinótipos maternos sejam transferidos à respectiva criança (BERKOWITZ & JONES, 1985).

Atualmente, a Mutacinotipagem, aplicada para a classificação fenotípica de estreptococos grupo mutans, tem se mostrado limitada. Para VINCENT *et al.* (1998), o uso de sobrenadantes de culturas ao invés de bacteriocinas purificadas, em testes de antagonismo, pode criar resultados restritos quanto à atividade bacteriocinogênica da cepa. A utilização de bacteriocinas purificadas em análises comparativas entre cepas produtoras é absolutamente essencial, visto que uma cepa bacteriocinogênica pode sintetizar mais de um tipo de bacteriocina (VINCENT *et al.*, 1998).

Mesmo diante das restrições da técnica, a mutacinotipagem ainda é empregada (van LOREVEN *et al.* 2000), principalmente associada aos métodos de tipagem moleculares (GRÖNROOS *et al.*, 1998), assim como em associação com estudos sobre a ecologia microbiana e a purificação de novas bacteriocinas, aplicáveis na biotecnologia de

conservação de alimentos, e futuramente, na terapia medicamentosa e na prevenção de doenças infecciosas.

Para a impressão digital ou “*fingerprinting*” de espécies bacterianas, métodos de tipagem moleculares apresentam maior capacidade discriminatória e confiabilidade em relação aos métodos de tipagem tradicionais, pois não analisam a expressão do gene, mas o DNA dos microrganismos (GRÖNROOS & ALALUUSUA, 2000).

## 2.7. MÉTODOS DE TIPAGEM MOLECULARES

Os métodos de biologia molecular têm sido aplicados com sucesso em estudos de diversidade genética e de transmissibilidade dos estreptococos grupo mutans (CAUFIELD & WALKER, 1989; KULKARNI *et al.*, 1989; SAARELA *et al.*, 1993; SPOLIDÓRIO *et al.*, 2001; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001a; KLEIN *et al.*, 2002). Métodos como Análise de Restrição da Endonuclease (REA), Análise do Polimorfismo do Fragmento de Restrição (RFLP) e a Reação de Polimerase em Cadeia com *Primers* Arbitrários (AP-PCR) demonstraram a heterogeneidade genética intra-espécie de estreptococos grupo mutans (SAARELA *et al.*, 1996; BOWDEN & HAMILTON, 1998; LI & CAUFIELD, 1998).

Em 1990, WELSH & Mc CLELLAND criaram a técnica de AP-PCR (Reação da Cadeia em Polimerase com Iniciadores Arbitrários), também denominada RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso) capaz de gerar uma “impressão digital” (“*fingerprinting*”) de produtos de DNA, isolados de diferentes espécies, utilizando “*primers*” de sequência arbitrária.

Resumidamente, através de ciclos de temperatura e presença de *Taq Polimerase*, o “*primer*” arbitrário se anela aos segmentos complementares, no DNA genômico. Tais

segmentos anelados são amplificados, originando uma série de *amplicons* de DNA de extensões variadas, que podem ser separados, eletroforéticamente, em gel de agarose, gerando padrões de AP-PCR ou o “*fingerprinting*” do isolado. Os padrões podem, então ser comparados para a análise filogenética (MENARD *et al.*, 1992; COLBY *et al.*, 1995).

WILLIAMS *et al.* (1990) relataram que as mutações pontuais (alterações em apenas um par de bases) são suficientes para causar a não complementariedade do “*primer*” ou oligonucleotídeo com a fita molde de DNA, impedindo a amplificação do segmento. O polimorfismo genético pode incluir deleções ou inserções nos sítios de ligação do “*primer*”, que aumentam as distâncias a serem percorridas pela *Taq* polimerase. Os marcadores RAPD (Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso) determinam o polimorfismo genético através de uma natureza binária, podendo o segmento amplificado estar presente ou ausente no genoma. O aparecimento das bandas eletroforéticas permite a observação da natureza molecular do polimorfismo genético pesquisado.

A técnica RAPD é especialmente aplicável no estudo de microrganismos com crescimento restrito porque a alta sensibilidade do método permite o emprego de pequenas quantidades de DNA (nanogramas) (WANG *et al.*, 1993).

A principal vantagem da técnica, é que conhecimentos prévios sobre a seqüência alvo de DNA da espécie bacteriana não são requeridos. Nos últimos anos, esta técnica de detecção de polimorfismo de DNA tem sido largamente empregada na caracterização genotípica de várias espécies bacterianas, incluindo patógenos orais (WILLIAMS *et al.*, 1990; CHEN & SLOTS, 1995; LI & CAUFIELD, 1998).

Métodos de tipagem genotípica, como a análise de polimorfismos de fragmentos de DNA, têm revelado considerável heterogeneidade genética entre estreptococos grupo

mutans. Em um mesmo indivíduo, foi possível detectar a presença de mais de um genótipo, sendo que indivíduos, epidemiologicamente não relacionados, apresentaram genótipos de estreptococos orais distintos (CAUFIELD & WALKER, 1989; KULKARNI *et al.*, 1989; KOZAI *et al.*, 1991; SAARELA *et al.*, 1993; ALALUUSUA *et al.*, 1994).

Segundo WANG *et al.* (1993), a distinção de cepas bacterianas, através de métodos de genotipagem, é importante para o tratamento de doenças emergentes e para compreender a estrutura genética e a evolução de populações microbianas.

Empregando a técnica de AP-PCR, SAARELA *et al.* (1996) analisaram diferentes espécies e sorotipos de estreptococos orais. Este estudo realizou a genotipagem por AP-PCR em 127 cepas de *S. mutans* e *S. sobrinus* isoladas de 65 indivíduos (1-10 por indivíduo). Os dois oligonucleotídeos ou iniciadores arbitrários utilizados, OPA-05 e OPA-13, foram adequados para distinguir os isolados *S. mutans* e *S. sobrinus* entre e intra-espécies, mas nenhum dos iniciadores detectou diferenças sorotipo-específicas.

LI & CAUFIELD (1998) concluíram que a técnica de AP-PCR foi capaz de distinguir cepas de estreptococos grupo mutans entre indivíduos etiologicamente não relacionados bem como detectar homogeneidade e heterogeneidade entre genótipos destas espécies em pares mãe-filho(a). Além de possuir alta reprodutibilidade, a técnica pode apresentar vantagens em estudos sobre epidemiologia, virulência e prevalência de estreptococos cariogênicos.

Determinar se duas cepas bacterianas são únicas, idênticas ou clones relacionados, depende da comparação de suas características fenotípicas e genotípicas. Este princípio foi proposto por LI & CAUFIELD (1998). Tais autores sugeriram que a presença ou ausência

de bandas (*amplicons*) poderia auxiliar na identificação de fatores de virulência ou de outras características fenotípicas.

A presença de *amplicons* comuns, em vários isolados de estreptococos grupo mutans, provavelmente, representa seqüências conservadas do genoma, e o seqüenciamento destes *amplicons* pode ser útil na construção de “*primers*” específicos para a rápida identificação destas espécies (LI & CAUFIELD, 1998).

SHIROZA *et al.* (1998) analisaram a diversidade genética entre isolados de estreptococos grupo mutans e estabeleceram uma correlação entre cariogenicidade e heterogeneidade genética. *S. mutans* foram isolados de pacientes com alta e baixa susceptibilidade à carie, sendo comparadas a produtividade de enzimas GTF e habilidade para formação de placa dental. Os resultados demonstraram que nem todos os isolados de *S. mutans* e *S. sobrinus* possuem as mesmas propriedades cariogênicas.

GRÖNROOS & ALALUUSUA (2000) utilizaram a técnica de AP-PCR para avaliar 598 isolados da placa dental e da saliva provenientes da cavidade bucal de 7 crianças entre 3-7 anos de idade. Os isolados foram testados quanto a sua capacidade de fermentar manitol, sorbitol e melibiose. Do total de isolados, 13 padrões de AP-PCR foram representativos de *S. mutans* e 2 padrões de AP-PCR representativos de *S. sobrinus*. Este estudo detectou de 1 a 4 perfis polimórficos de *S. mutans* nas crianças, e concluiu que a freqüência de distribuição dos genótipos difere com relação aos diferentes locais de isolamento das espécies. Observaram também que 2 crianças foram colonizadas por fenótipos de *S. mutans* fermentadores e não fermentadores de melibiose, que puderam ser, geneticamente, distinguidos através da técnica de AP-PCR. Estudos preliminares descreveram que o fenótipo melibiose negativo deve-se a deleção de genes cromossomais

(USHIRO *et al.*, 1991; RUSSELL *et al.*, 1992). No ambiente da cavidade oral, a aquisição de fragmentos de DNA e de novos traços por mutação pode alterar os microrganismos (SOLOMON & GROSSMAN, 1996; LAWRENCE, 1997; BOWDEN & HAMILTON, 1998).

Os estudos da biodiversidade de espécies cariogênicas podem ser um campo promissor para a Odontologia , principalmente, quando associados aos estudos de virulência e patogenicidade dos principais agentes etiológicos da cárie dental, visto que diferentes genótipos, em um mesmo indivíduo, podem variar na expressão das características patogênicas (KÖHLER & KRASSE, 1990, CAUFIELD, 1997; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001b).

### 3. PROPOSIÇÃO

Este trabalho de tese foi realizado com os objetivos de:

- comparar a atividade mutacinogênica de *S. mutans* isolados de voluntários cárie-ativos e livres de cárie;
- analisar e comparar a diversidade fenotípica quanto à produção de mutacinas e a diversidade genotípica, entre os dois grupos analisados;
- determinar e comparar o grau de associação ou coeficiente de contingência entre os agrupamentos fenotípicos por mutacinotipagem e genotípicos pela técnica AP-PCR;
- determinar e comparar os índices discriminatórios da mutacinotipagem e AP-PCR, aplicadas na tipagem de *S. mutans*.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Seleção dos voluntários

Foram selecionados 16 voluntários, de ambos os sexos, e sem história médica do uso de medicação antibiótica ou imunossupressora, nos últimos seis meses. Oito voluntários eram alunos do curso de graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP/UNICAMP, com idades variando entre 18-22 anos (média =  $20,25 \pm 1,43$  anos) e apresentavam índice CPOD igual a zero (WALTER & SHKLAIR, 1982). Os outros 8 voluntários, eram pacientes da clínica de graduação da FOP/UNICAMP, apresentavam idades entre 19-29 anos (média =  $28,12 \pm 3,07$  anos) e cáries-ativas, com índice CPOD  $\geq 8$  (média =  $12,0 \pm 3,07$ ).

### 4.2. Colheita das amostras (saliva, placa dental e dorso de língua)

As colheitas foram realizadas, em jejum, entre 8 e 9 horas da manhã. Os voluntários dispensaram saliva não estimulada em tubos estéreis, até a quantidade aproximada de 1 mL.

Com o auxílio de um Swab estéril, foram coletadas as amostras da placa dental (faces vestibulares e linguais dos dentes) e as amostras do dorso de língua. As amostras da placa dental e dorso de língua foram dissolvidas em solução salina 0,9%.

Todas as amostras foram submetidas a 30 segundos de vibração em um agitador de tubos (Phoenix – AT 56), visando a obtenção de uma suspensão uniforme. Em seguida, foram diluídas em série decimais de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  em solução salina a 0,9% estéril.

### 4.3. Isolamento e caracterização de *S. mutans*

Para o cultivo de *S. mutans*, alíquotas de 100 µL de cada diluição (de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup>) foram inoculadas, em duplicata, em placas de Petri contendo ágar Mitis Salivarius com Bacitracina (MSB – anexo 1.1). Após incubação a 37°C, por 24 horas e em atmosfera P<sub>CO2</sub> de 10% (Cole-Parmer®), foram coletadas de 10 a 20 colônias com morfologia típica de estreptococos grupo mutans, crescidas em diferentes pontos da superfície do meio. Cada colônia foi transferida para 1 tubo de cultura contendo caldo de infusão de cérebro e coração (BHI – anexo 1.2). As culturas foram mantidas em condições ótimas de crescimento celular (37°C, P<sub>CO2</sub> 10%, 24 horas) e após o crescimento, alíquotas de 500µL da cultura foram armazenadas em BHI glicerol a 10% (anexo 1.3), a -20°C, para posteriores análises e o restante foi utilizado para os testes de identificação bioquímica, descritos a seguir.

A identificação das cepas de estreptococos grupo mutans foi realizada, previamente, através de provas bioquímicas, seguindo-se os critérios adotados no Manual de Bergey (HARDIE, 1986). Foram utilizadas as provas de fermentação de manitol, sorbitol, melibiose e rafinose, hidrólise de arginina, produção de peróxido de hidrogênio e sensibilidade à bacitracina. A confirmação da espécie de *S. mutans* também foi avaliada por PCR (ROSA, 2001), utilizando iniciadores específicos para a porção gênica correspondente a glicosiltransferase (gtfB) de *S. mutans* (OHO *et al.*, 2000).

### 4.4. Mutacinotipagem

Um total de 319 isolados de *S. mutans*, 141 isolados do grupo cárie-ativo e 178 do grupo livre de cárie, foram submetidos à Mutacinotipagem à técnica de AP-PCR, após o

consentimento do Departamento de Microbiologia e Imunologia da FOP/UNICAMP e Comitê de Ética em Pesquisa (processo nº137/2001 – anexo 5).

A bacteriocinotipagem foi aplicada através da modificação do método do antagonismo proposto por Fredericq (HAMADA & OOSHIMA, 1975a), segundo recomendações de GRÖNROOS *et al.* (1998).

Os inóculos das cepas testadas como produtoras de bacteriocina ou substância semelhante à bacteriocina (cepas testes) e das cepas indicadoras da produção dessas substâncias foram preparadas a partir de culturas recentes (24 horas, a 37°C, pCO<sub>2</sub> a 10%) em caldo infusão de cérebro e coração (BHI – anexo 1.2) e caldo de soja triptico (TSB – anexo 1.5), respectivamente.

#### 4.4.1. Semeadura das Cepas Testes

As cepas *S. mutans* estocadas foram crescidas à 37° C, Pco<sub>2</sub> 10%, por 24 horas, em tubos contendo 3 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI), enriquecido com 0,5% de extrato de levedura (anexo 1.2). Após 24 horas de incubação, confirmou-se a pureza das culturas pelo método de coloração de Gram. Suspensão de células (500 µL) foram transferidas para tubos Eppendorf, que foram centrifugados por 2 min a 5.000 RPM; as células sedimentadas foram lavadas com solução salina (NaCl a 0,9%), até ser acertada a concentração 0,5 da escala de Mc Farland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL).

As cepas testadas como produtoras de mutacinas, crescidas em BHI, foram inoculadas pelo método da picada com agulha de platina em placa de Petri contendo meio ágar soja triptico (TSA a 1,5% - anexo 1.4). A semeadura de 16 cepas teste/placa (20x100mm) foi eqüidistante (FIG.5) e realizadas em duplicata. As placas foram então

incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (Pco<sub>2</sub> a 10%), a 37° C por 48 horas, na posição invertida. A figura 2 demonstra, resumidamente, a inoculação das cepas testes pela Mutacinotipagem.

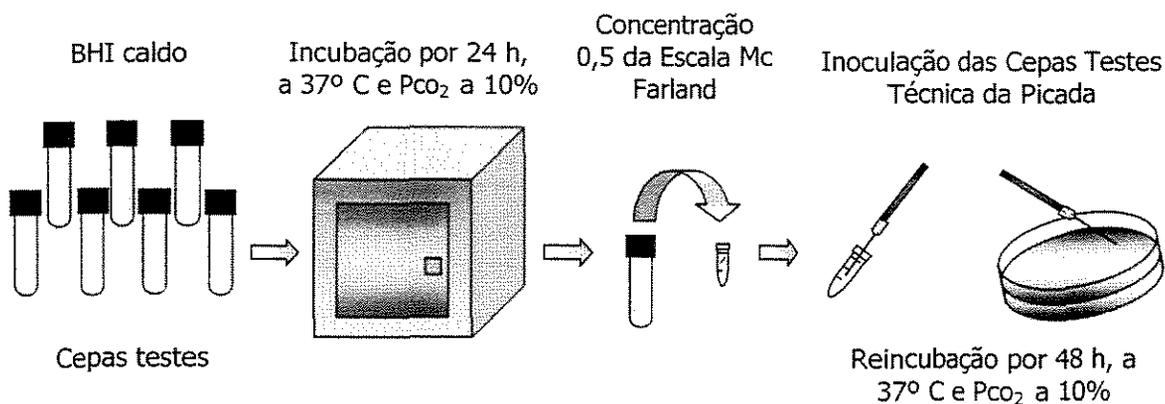


Figura 2 – Mutacinotipagem: Inoculação das cepas testes

#### 4.4.2. Semeadura das Cepas Indicadoras

As cepas indicadoras de produção de mutacinas ou substâncias semelhantes as mutacinas estavam liofilizadas. Após a ativação em BHI caldo e incubação por 24 horas, a 37° C e pCO<sub>2</sub> a 10%, estas cepas foram preservadas em tubos Eppendorf com BHI Glicerol a 10% e mantidas a -70° C.

Foram utilizadas 13 cepas indicadoras: *Streptococcus mutans* CCT3440, *S. mutans* 32K, *Streptococcus sobrinus* ATCC27607, *S. sobrinus* 6715, *Streptococcus mitis* A, *S. mitis* ATCC903, *Streptococcus sanguinis* CR311, *S. sanguinis* M5, *S. sanguinis* ATCC10556, *Streptococcus salivarius* ATCC25975, *S. salivarius* 66,4, *Streptococcus oralis* PB182 e *Streptococcus cricetus* HS6.

As cepas foram reativadas em TSB enriquecido com 0,5% de extrato de levedura (anexo) e incubadas a 37° C, Pco<sub>2</sub>, por 24 horas. Após o crescimento, as culturas foram testadas quanto a sua pureza através do método de coloração de Gram.

Confirmada a pureza, alíquotas de 500µL da cultura foram transferidas para tubos Eppendorf, sendo centrifugados por 2 min a 5.000 RPM. As células sedimentadas foram lavadas com solução salina (NaCl a 0,9%), até ser acertada a concentração 0,5 da escala de Mc Farland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL).

A suspensão da cepa indicadora (500µL) foi adicionada a 4,5 mL de TSA semi-sólido a 0,8% (anexo – 1.6) estéril, a 50-55°C. Após homogeneização com auxílio de agitador, o meio foi vertido (*Pour Plate*), assepticamente, sobre a placa contendo os inóculos de cepas testes, com 48 horas de crescimento. Após solidificação da película indicadora, as placas foram reincubadas, na posição invertida, nas mesmas condições, por mais 24 horas. Os halos de inibição foram medidos em mm, considerando-se as médias das duplicatas para posterior classificação pelo sistema digital.

A figura 3 demonstra, resumidamente, a técnica de inoculação das cepas indicadoras, pela Mutacinotipagem.

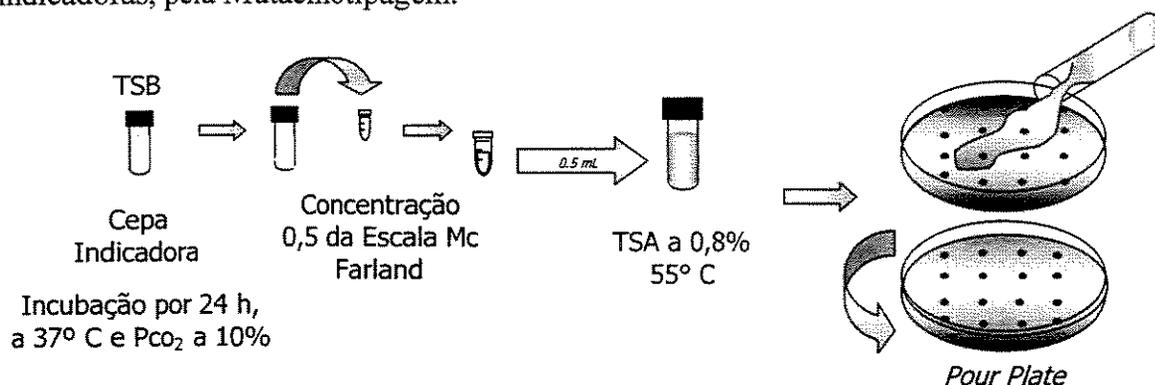


Figura 3 – Mutacinotipagem: Técnica do Pour Plate

#### 4.4.3. Leitura dos Resultados

A leitura dos resultados, foi realizada seguindo-se recomendações de BROCK *et al.*(1963) e de ROGERS (1976). As zonas de inibição do crescimento das cepas indicadoras, em torno dos pontos de inoculação das cepas produtoras foram mensuradas,

obtendo-se o diâmetro dos halos de inibição (em mm), sendo a cepa correspondente considerada como bac + (bacteriocina positiva ou produtora de bacteriocina) se o halo fosse  $\geq 4,0$  mm de diâmetro (HAMADA & OOSHIMA, 1975b; ALALUUSUA *et al.*, 1991). Foram utilizadas 13 cepas indicadoras para traçar o perfil de cada isolado, possibilitando, posteriormente, o agrupamento fenotípico mutacinogênico dos isolados para cada voluntário.

Para cada 3 cepas indicadoras, 1 “score” foi dado ao isolado, dependendo da sensibilidade das cepas indicadoras a mutacina do mesmo (tabela 1), assim todo isolado foi caracterizado por cinco dígitos (perfil ou padrão de mutacina/ mutacinogênico). O esquema digital proposto por TAGG & BANNISTER (1979), foi aplicado por DAMETTO (1987), AZEVEDO (1988) e van LOREVEN *et al.* (2000).

Tabela 1- Sistema para transformação da produção de bacteriocina contra 3 cepas indicadoras em um único valor numérico

Score	Cepas Indicadoras		
	1	2	3
0	-	-	-
1	+	-	-
2	-	+	-
3	+	+	-
4	-	-	+
5	+	-	+
6	-	+	+
7	+	+	+

- = produção negativa contra a cepa indicadora  
 + = produção positiva contra a cepa indicadora

Para a impressão digital dos isolados, as 13 cepas indicadoras foram agrupadas em 5 trios (tabela 2), obedecendo sempre a mesma ordem, para posterior análise ou agrupamento

das cepas testes com mesmo padrão bacteriocinogênico/mutacinogênico, mutacinótipo ou padrão de bacteriocina.

Tabela 2 - Agrupamento das 13 Cepas Indicadoras em 5 trios – Sistema Digital

Dígito	Ordem das cepas indicadoras
1°	<i>S. mutans</i> CCT3440 <i>S. mutans</i> 32K <i>S. sobrinus</i> ATCC27607
2°	<i>S. sobrinus</i> 6715 <i>S. mitis</i> A <i>S. mitis</i> ATCC903
3°	<i>S. salivarius</i> ATCC15975 <i>S. salivarius</i> 66.4 <i>S. sanguinis</i> CR311
4°	<i>S. sanguinis</i> M5 <i>S. sanguinis</i> ATCC10556 <i>S. oralis</i> PB182
5°	<i>S. cricetus</i> HS6 <i>S. sanguinis</i> CR311 <i>S. sanguinis</i> M5

As cepas indicadoras *S. sanguinis* M5 e *S. sanguinis* CR311 foram utilizadas também para o 5° dígito por apresentarem maior variabilidade (+ ou -) quanto à sensibilidade às bacteriocinas produzidas pelos isolados em questão.

#### 4.5. AP-PCR

##### 4.5.1. 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 CO<sub>2</sub> a 10% (Cole Parmer®). Após o crescimento bacteriano, as células foram centrifugadas, lavadas duas vezes com solução tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) pH 8,0 (anexo 2.3) e submetidas a um “banho de fervura”, por 10 minutos, para o rompimento celular e a extração de DNA (SAARELA *et al.*, 1996). A concentração do material genético foi calculada em espectrofotometria óptica, medindo-se a absorbância a 260 nm.

#### 4.5.2. AP-PCR

A reação de AP-PCR foi processada segundo SAARELA *et al.* (1996). Cerca de 350 ng de DNA foram adicionados a uma mistura de reagentes contendo solução tampão (10X Reaction Buffer Taq Polymerase), 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP (DNA Polymerization Mix), 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 a amplificação através de 35 ciclos, em um aparelho termociclador convencional (GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer®) 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 por 5 min (FIG. 5).

Para testar a reprodutibilidade da AP-PCR, o DNA extraído da cepa padrão *S. mutans* CCT3440 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'

#### 4.5.3. Eletroforese

Os produtos resultantes da amplificação por AP-PCR foram conservados a -20°C ou foram analisados, imediatamente, por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE - pH 8.0) (anexo 2.1). Estes produtos amplificados foram adicionados ao tampão de corrida (Loadwing buffer) (anexo 2.2), em partes iguais, foram colocados no

gel de agarose e submetidos à corrida eletroforética (90mV, por 2 horas) (figura 5). Em cada gel, foi incluído, um padrão de peso molecular de 100 pb. Após o término de cada corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (10 min) e as bandas observadas com auxílio de um transluminador de luz ultravioleta.

O esquema da figura 4, resume a extração e a amplificação de DNA na técnica de AP-PCR.

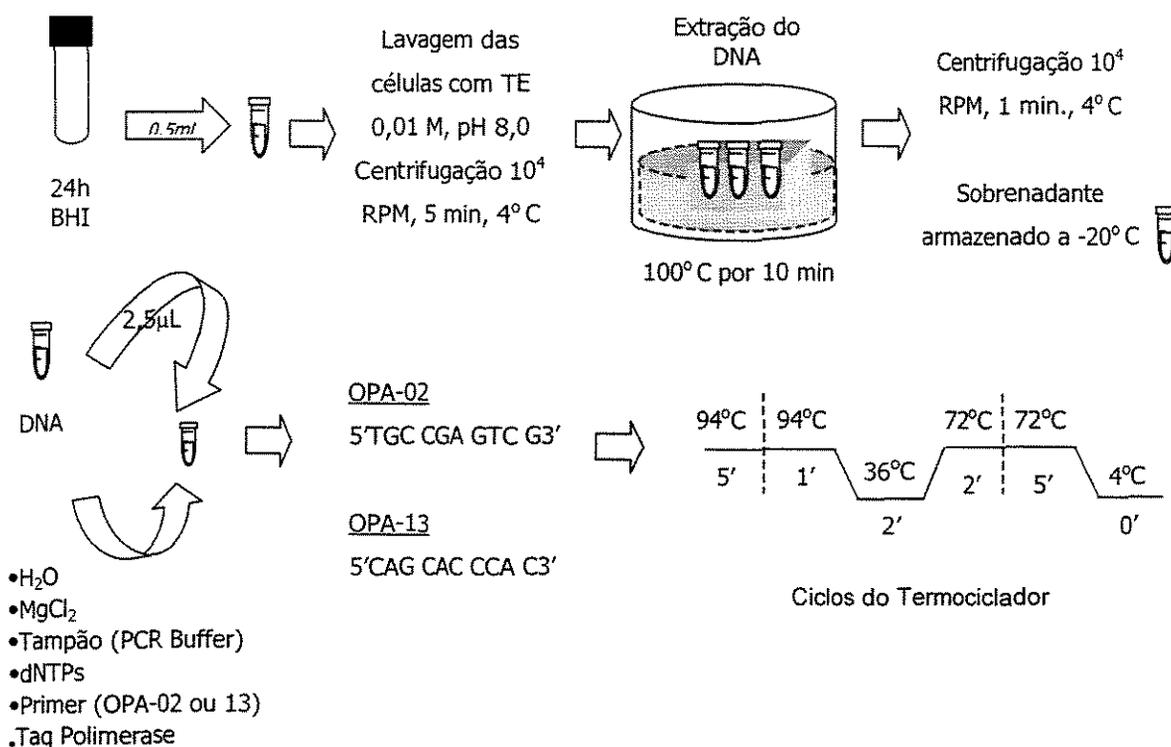


Figura 4 - Extração e Amplificação de DNA de *S. mutans*

#### 4.4.4. Análise do padrão eletroforético

A documentação fotográfica foi obtida com o sistema Image Master -VDS (Pharmacia Biotec<sup>®</sup>) e a captura das imagens foi realizada pelo programa computacional LISCAP (figuras 6 e 7). As imagens positivas e a demarcação das bandas eletroforéticas de maiores intensidades foram processadas através do programa Sigma Gel (Jandel Co<sup>®</sup>),

visualmente, para a obtenção da mobilidade relativa de cada banda (valores de Rf) em função dos valores conhecidos dos padrões de massa molecular (100pb).

As bandas eletroforéticas representadas pelos valores de Rf 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 1.70 (Applied Biostatistics), para construção de dendogramas. Empregou-se o programa QUALITATIVE e o coeficiente de similaridade DICE.

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 dendogramas para as avaliações dos graus de similaridade entre as amostras de *S. mutans* analisadas.

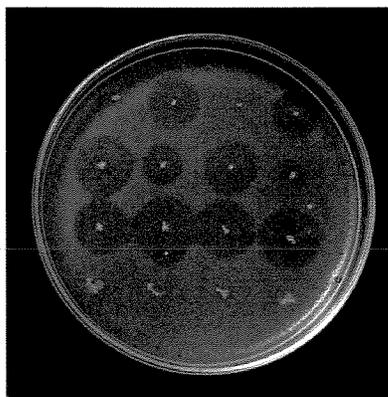


Figura 5 - Atividade mutacinogênica *in vitro* pela Técnica do Antagonismo Proposto Modificado, placa com 16 cepas testes com inoculações eqüidistantes.

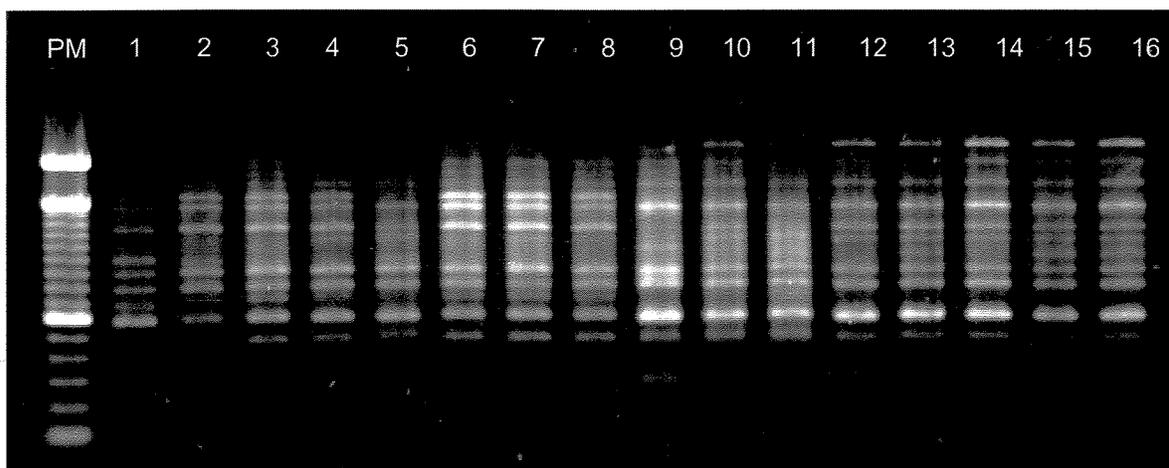


Figura 6 - Fotografia do gel de agarose, demonstrando a diversidade genética de *S. mutans* em um voluntário ("primer" OPA-02). Linha 1: *S. mutans* CCT3440; linhas de 2 a 16: isolados clínicos de *S. mutans*.

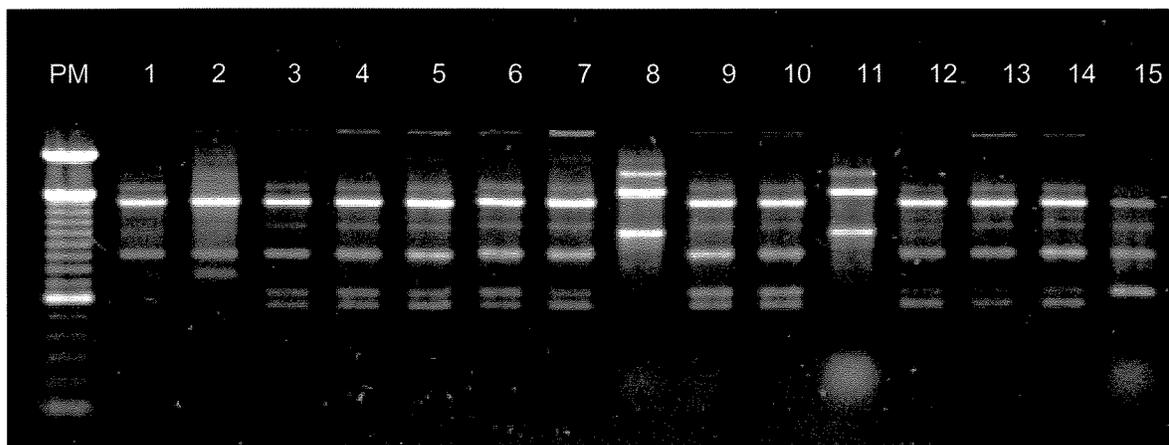


Figura 7 - Fotografia do gel de agarose, demonstrando a diversidade genética de *S. mutans* em um voluntário ("primer" OPA-13). Linha 1: *S. mutans* CCT3440; linhas de 2 a 15: isolados clínicos de *S. mutans*.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Mutacinotipagem

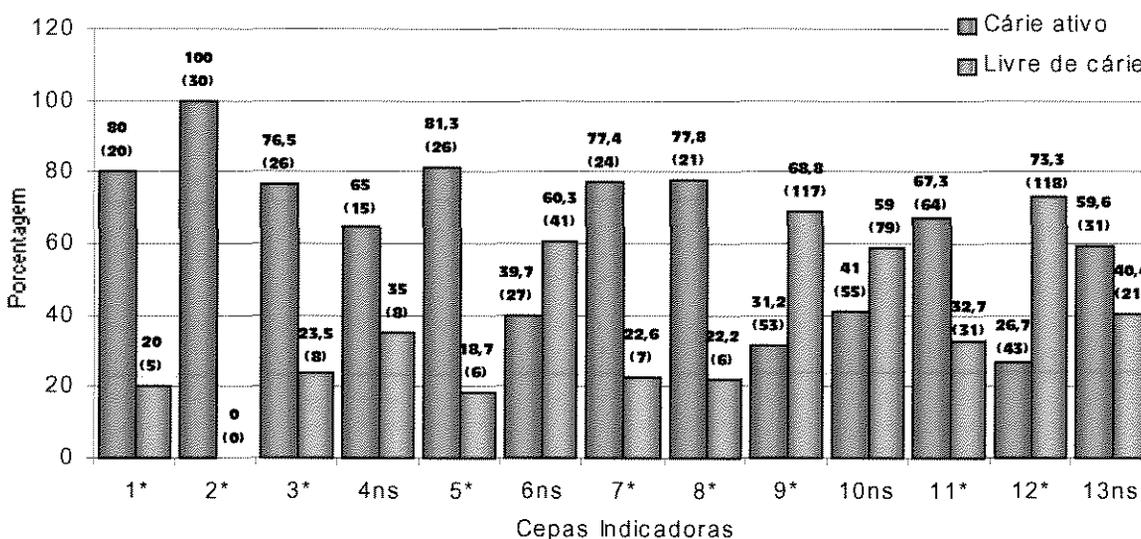
Através da Mutacinotipagem, foram detectados 55 mutacinótipos diferentes num total de 319 isolados de *S. mutans* analisados. Cerca de 79,62% (254/319) dos isolados produziram mutacinas ou substâncias semelhantes a elas contra uma ou mais cepas indicadoras utilizadas. Cerca de 22,69% (32/141) e 18,53% (33/178) das cepas de *S. mutans* do grupo cárie-ativo e livre de cárie, respectivamente, não produziram mutacina contra nenhuma das cepas indicadoras analisadas.

No presente estudo, as cepas que apresentaram maiores espectros inibitórios, não foram as mais freqüentemente isoladas. Dois voluntários cárie-ativos e 2 livres de cárie - C (6/11); D (11/27); C2 (9/19) e C4 (11/16) - apresentaram como biotipos predominantes cepas com padrão mutacinogênico [00000] (não produziram mutacina contra nenhuma das 13 cepas indicadoras).

Os principais resultados contrastantes entre os dois grupos analisados foram em relação à atividade e ao perfil mutacinogênicos (FIG.8). As cepas isoladas de indivíduos com cárie apresentaram maior potencial mutacinogênico e amplo espectro inibitório contra as diferentes cepas indicadoras utilizadas.

Os perfis de produção de mutacinas, entre os dois grupos, também se diferenciaram, o que poderia indicar relação com os diferentes perfis de colonização e prevalência de estreptococos em indivíduos com alto e baixo risco de cárie dental, previamente descritos.

Observa-se na FIG.8, que os isolados de voluntários livres de cárie apresentaram maior atividade inibitória contra colonizadores primários, como *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. mitis* e baixo efeito inibitório contra microrganismos cariogênicos, representados por *S. mutans* e *S. sobrinus*.



Legenda (eixo x)

1. *Streptococcus mutans* CCT 3440; 2. *Streptococcus mutans* 32K; 3. *Streptococcus sobrinus* ATCC 27607; 4. *Streptococcus sobrinus* 6715; 5. *Streptococcus mitis* A; 6. *Streptococcus mitis* ATCC 903; 7. *Streptococcus sanguinis* CR 311; 8. *Streptococcus sanguinis* M5; 9. *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556; 10. *Streptococcus salivarius* ATCC 25975; 11. *Streptococcus salivarius* 66,4; 12. *Streptococcus oralis* PB182; 13. *Streptococcus cricetus* HS6

\* diferem entre si pelo teste Qui-quadrado (p = 0,05)

ns – não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado (p = 0,05)

Figura 8 – Gráfico da porcentagem (número de cepas bac+) de *S. mutans* isolados de voluntários cárie-ativos e livres de cárie produtores de mutacina contra as 13 cepas indicadoras.

## 5.2. Mutacinotipagem & AP-PCR

### 5.2.1. Diversidade Fenotípica & Genotípica

A Mutacinotipagem a AP-PCR permitiram classificar e agrupar cepas de *S. mutans* com perfis similares, demonstrando a heterogeneidade fenotípica e genotípica, respectivamente, intra-indivíduo. As tabelas 4 e 5 mostram o total de perfis mutacinogênicos e genotípicos encontrados nos dois grupos analisados.

Tabela 4 - Total de cepas de *S. mutans* analisadas, perfis fenotípicos e genotípicos encontrados em cada voluntário do grupo cárie-ativo.

	Voluntários								
	C1	C2	C3	C4	C5	C7	C8	C9	Total
Total de Cepas	27	19	19	16	11	16	16	17	141
Fenótipos	6	6	7	4	5	6	6	9	49
Clones AP-PCR	4	13	9	8	5	10	4	8	61

Tabela 5 - Total de cepas de *S. mutans* analisadas, perfis fenotípicos e genotípicos encontrados em cada voluntário do grupo livre de cárie.

	Voluntários								
	A	C	D	E	G	I	O	R	Total
Total de Cepas	29	11	27	22	21	27	25	16	178
Fenótipos	6	5	7	4	8	4	7	3	44
Clones AP-PCR	7	5	4	5	6	4	7	2	40

Através da análise pelo Coeficiente de Correlação de Pearson, não foi encontrada correlação positiva entre o número de isolados testados e o número de genótipos detectados ( $p = 0,67$ ;  $r = -0,11$ ).

No presente estudo, também não houve relação entre a atividade de cárie e diversidade fenotípica/genotípica. Estes resultados são expressos nas figuras 9 e 10.

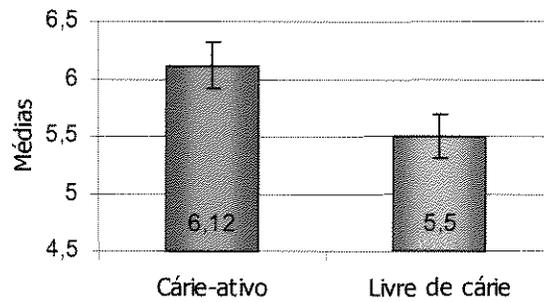


Figura 9 - Gráfico das médias e intervalos de confiança do número de fenótipos obtidos por Mutacinotipagem dos grupos cárie-ativo e livre de cárie.

O teste t de Student para duas amostras independentes não revelou diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,61$ ) entre as médias do número de fenótipos obtidos por Mutacinotipagem, nos dois grupos estudados.

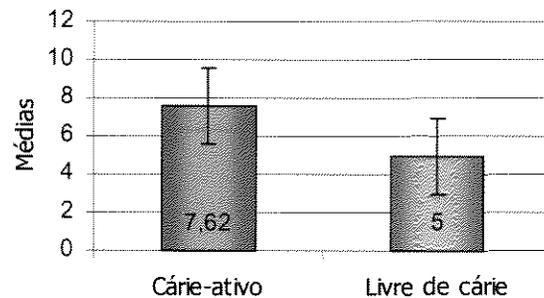


Figura 10 – Gráfico das médias e intervalos de confiança do número de genótipos obtidos por AP-PCR dos grupos cárie-ativo e livre de cárie.

O teste t de Student para duas amostras independentes não revelou diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,12$ ) entre as médias do número de genótipos obtidos por AP-PCR, nos dois grupos estudados.

#### 5.2.2. Coeficientes de Contingência

Para correlacionar a confiabilidade da Mutacinotipagem, no estudo da diversidade de *S. mutans*, empregou-se nas mesmas cepas analisadas, fenotipicamente, a técnica genotípica de AP-PCR. O grau de associação ou coeficiente de contingência entre os dois métodos de agrupamento foi calculado a partir da construção de tabelas de contingência para a associação dos diferentes dados obtidos (anexo 3 – estatística). A média dos coeficientes de contingências obtidos através de 16 tabelas de contingência (tabelas 6-21) foi de 77,38%, revelando que resultados mais precisos foram obtidos quando a Mutacinotipagem foi associada ao método de tipagem molecular, neste caso a técnica de AP-PCR.

Em apenas 2 dos 16 voluntários analisados (voluntários A e E), comprovou-se estatisticamente, a associação verdadeira entre os 2 métodos de agrupamentos empregados. Nas tabelas 4.1 e 4.2 (anexo 4) observam-se o total de cepas analisadas, os números de genótipos/fenótipos observados por voluntário, os coeficientes de contingência entre as técnicas e o valor de p detectados no teste Likelihood  $\chi^2$ .

Embora, a Mutacinotipagem apresente restrições de uso, foi possível detectar, através dela, diferenças fenotípicas importantes para o estudo e compreensão da ecologia de *S. mutans*, bem como, foi possível demonstrar heterogeneidade da espécie, num mesmo indivíduo.

### 5.2.3. Dendogramas e Tabelas de Contingência

Os dendogramas, representativos do agrupamento genotípico de *S. mutans* para cada voluntário livre de cárie (A-R), e as tabelas de contingência, para a associação entre as duas técnicas de agrupamento, estão apresentados pelas figuras 11-18, e tabelas 6-13, respectivamente.

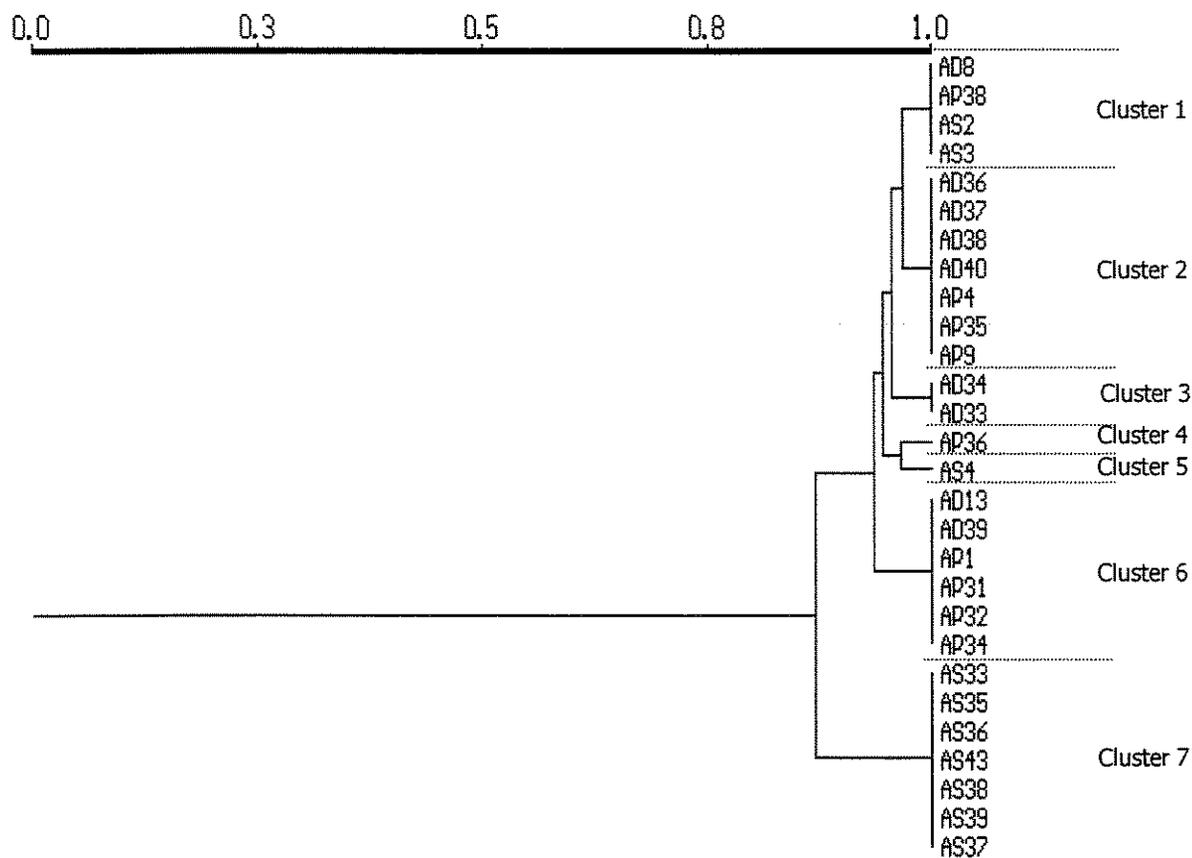


Figura 11 - Dendrograma representativo do agrupamento genotípico de *Streptococcus mutans* presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário A, determinados por AP-PCR.

A figura 11 evidencia a ocorrência simultânea de sete tipos genéticos de *S. mutans*, na cavidade bucal do voluntário A. O cluster principal 7 foi isolado apenas de amostras de saliva (S), porém outro dominante numérico (cluster 2) foi isolado do dorso (D) e placa dental (P). A maior diversidade clonal foi detectada no dorso de língua e na placa dental (4/7) seguido pela saliva (3/7). Os clusters apresentaram alto grau de similaridade entre si ( $S_{SM} \geq 0,89$ ).

Para correlacionar o agrupamento genotípico obtido por AP-PCR com o fenotípico obtido por Mutacinotipagem, calculou-se o coeficiente de contingência entre os

dois diferentes tipos de agrupamento (anexo3- estatística). Na tabela de contingência para o teste de associação (tabela 6), observa-se a frequência de mutacinótipos, obtidos pela Mutacinotipagem, para cada grupo genotípico (ou cluster), determinado por AP-PCR.

Tabela 6. Tabela de contingência para associação de dados do voluntário A.

		Genótipos							Total fenótipos
		C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 7	
Mutacinótipos	Frequência	3	0	0	0	3	0	0	6
	[00456]	0	5	0	0	0	0	0	5
	[04442]	0	0	0	0	0	2	0	2
	[04476]	0	2	3	0	1	5	1	12
	[06776]	1	0	0	1	1	0	0	3
	[17776]	0	0	0	0	0	1	0	1
	Total de clones	4	7	3	1	6	7	1	29

\* C – Cluster do AP-PCR

O coeficiente de contingência ou magnitude de associação entre os dois métodos de agrupamento foi de 81,35%. Pela estatística do  $G^2$  (Likelihood Ratio  $\chi^2$ ), existem fortes indícios da existência de associação verdadeira entre os dois métodos de agrupamento utilizados ( $p < 0,05$ ), embora genótipos distintos apresentassem fenótipos iguais. Os mutacinótipos [04476] e [06776] distribuíram-se em 5 e 3 genótipos distintos, respectivamente. Embora a Mutacinotipagem não tenha diferenciado genótipos distintos obtidos por AP-PCR, a técnica pode ser considerada, neste caso, sensível, uma vez que estes genótipos têm grande similaridade genética entre eles, de 89% a 97,5%.

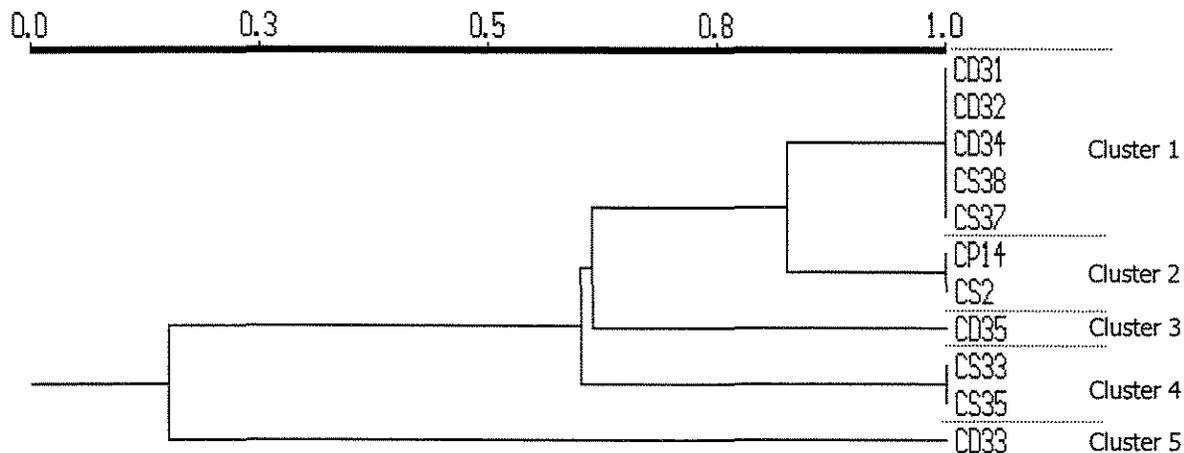


Figura 12 - Dendrograma representativo do agrupamento genotípico de *Streptococcus mutans* presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C, determinados por AP-PCR.

Na FIG.12, observam-se cinco tipos clonais de *S. mutans*, na cavidade bucal do voluntário C. O clone predominante (5/11=45,45% - cluster 1), mostrou-se concentrado no dorso (D) e saliva (S). Os clusters 3 e 4, numericamente menores, apresentaram grande dissimilaridade com o cluster principal ( $S_{SM} = 0,62$  e  $0,61$ , respectivamente), sendo o cluster 5, representado pela cepa CD33, muito distante das demais ( $S_{SM} = 0,22$ ).

Tabela 7. Tabela de contingência para associação de dados do voluntário C.

		Genótipos					Total fenótipos
		C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	
Mutacínótipos	Frequência	3	0	1	2	0	6
	[00000]	3	0	1	2	0	6
	[00462]	1	0	0	0	1	2
	[00640]	1	0	0	0	0	1
	[04456]	0	1	0	0	0	1
	[07456]	0	1	0	0	0	1
Total de clones		5	2	1	2	1	11

\* C - Cluster do AP-PCR

Neste caso, o coeficiente de contingência ou magnitude de associação entre as duas técnicas foi de 78,45%, e o  $p > 0,05$ , no teste  $G^2$  (Likelihood Ratio  $\chi^2$ ). Aceita-se assim, a hipótese de nulidade ( $H_0$ ), em que não houve associação verdadeira entre as duas técnicas

de agrupamento. Nota-se na tabela de contingência (TAB.7), baixa associação entre as duas técnicas, pois genótipos idênticos (dos clusters 1 e 2) apresentaram perfis mutacinogênicos muito distintos, e perfis genéticos altamente dissimilares (cluster 1 e 5), foram agrupados no mesmo perfil fenotípico. Além disso, 6 das 11 cepas testadas, pertencentes aos clusters 1, 3 e 4, apresentaram perfil mutacinogênico [00000].

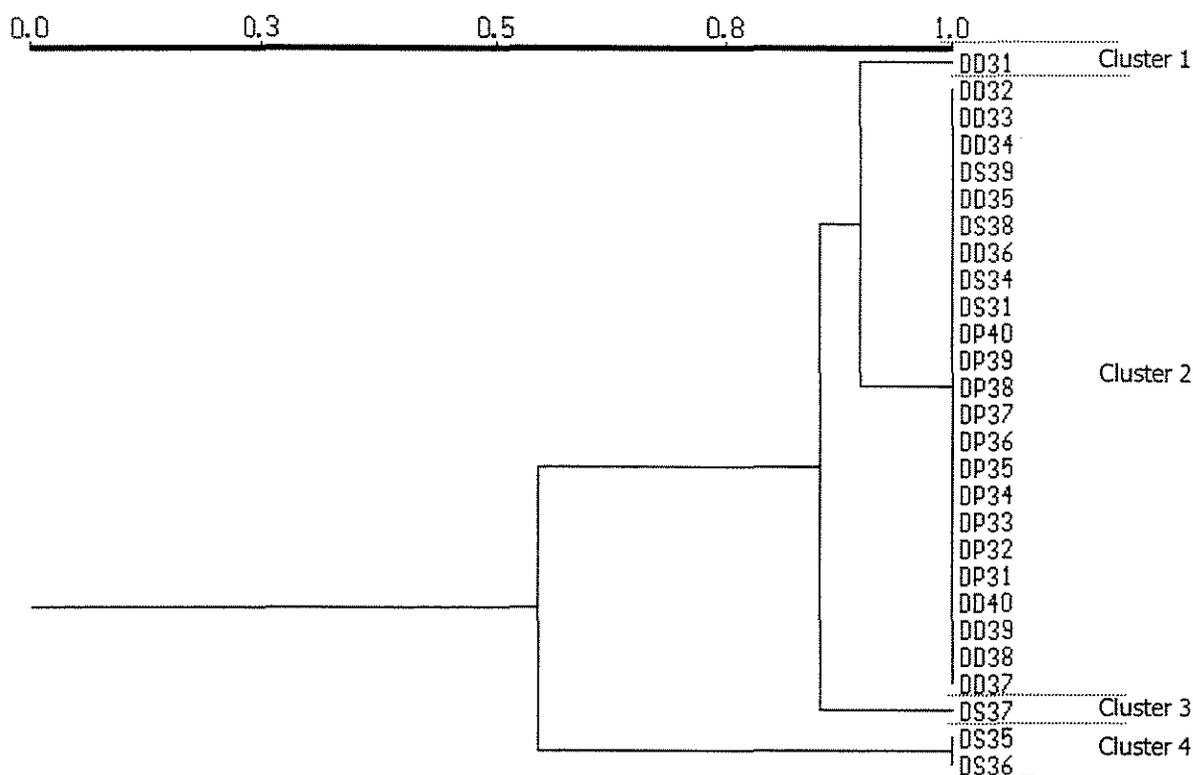


Figura 13 - Dendrograma representativo do agrupamento genotípico de *Streptococcus mutans* presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário D, determinados por AP-PCR.

A FIG.13 demonstra uma colonização polimórfica de *S. mutans* composta por 4 tipos clonais diferentes na cavidade bucal do voluntário D. O clone principal com 85,18% (23/27) dos isolados, foi encontrado nos três sítios de isolamento. Outros 3 grupos clonais menores (clusters 1,3 e 4) foram isolados da saliva (2/3) e do dorso de língua (1/3). Há

similaridade de  $S_{SM} \geq 0,89$  entre a cepa DS37 (cluster 3), e as cepas dos clusters 1 e 2. O quarto cluster, representado pelas cepas DS35 e DS36, apresentou menor similaridade com os demais ( $S_{SM} = 0,56$ ).

Os perfis mutacinogênicos obtidos foram correlacionados com os clusters formados genotipicamente (TAB. 8)

Tabela 8. Tabela de contingência para associação de dados do voluntário D.

		Genótipos				Total fenótipos
		C 1	C 2	C 3	C 4	
Mutacinótipos	Frequência	0	10	0	1	11
	[00000]	0	5	0	0	5
	[00001]	1	2	0	0	3
	[00014]	0	0	0	1	1
	[00403]	0	2	0	0	2
	[00405]	0	1	0	0	1
	[00445]	0	2	1	0	3
	[00456]	0	1	0	0	1
	[00447]	0	1	0	0	1
Total de clones	1	23	1	2	27	

\* C – Cluster do AP-PCR

O grau de associação entre as duas técnicas de agrupamento ou coeficiente de contingência, foi de 72,6%. Pelo teste do  $G^2$ , não há associação verdadeira entre as técnicas empregadas ( $p > 0,05$ ). O número de perfis fenotípicos obtidos através da Mutacinotipagem ( $n = 8$ ) foi muito superior ao número de genótipos obtidos através da AP-PCR ( $n = 4$ ). O genótipo principal, representante do cluster 2, por exemplo, apresentou 7 dos 8 perfis mutacinogênicos detectados na Mutacinotipagem.

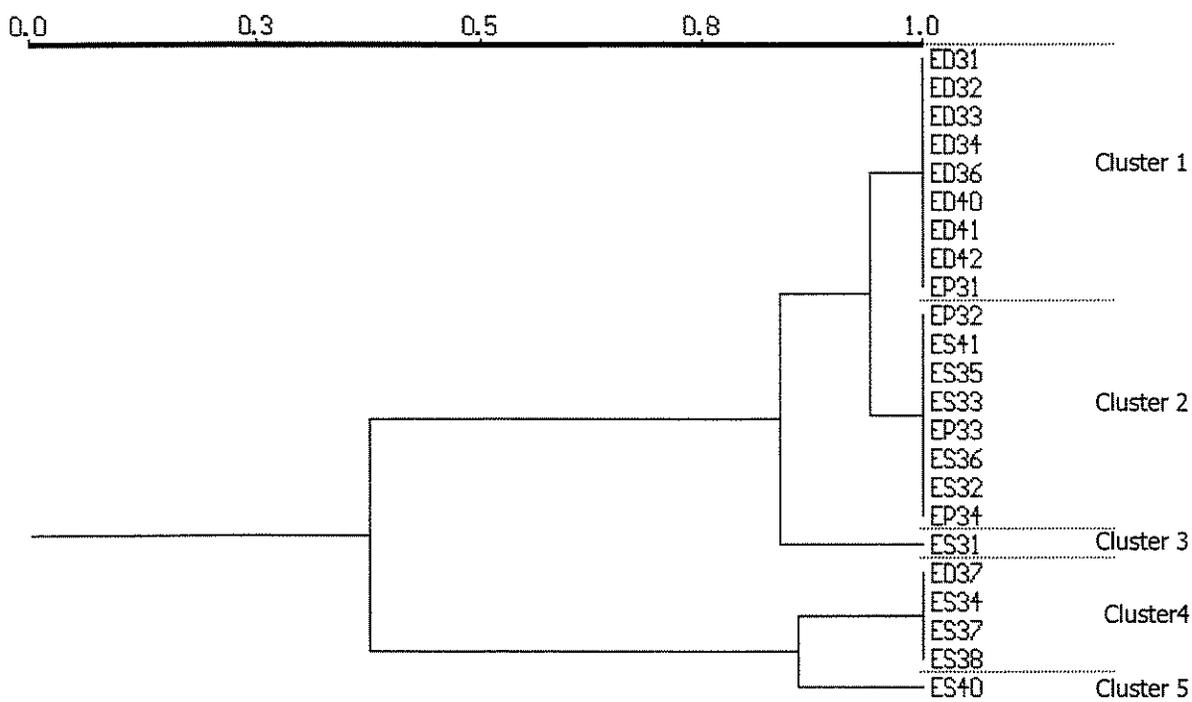


Figura 14 - Dendrograma representativo do agrupamento genotípico de *Streptococcus mutans* presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário E, determinados por AP-PCR.

O total de *S. mutans* (23) isolados da cavidade bucal do voluntário e foram agrupados em cinco genótipos diferentes, através da técnica de AP-PCR (FIG.14). O genótipo principal (cluster 1) representado por 9 cepas foi detectado predominantemente no dorso de língua (8/9) e placa dental (1/9). Embora na saliva não tenha sido isolado o genótipo principal, este sítio foi o que se apresentou com maior diversidade genotípica (4 genótipos), seguido pela placa dental e dorso de língua (ambos com 2 clones). Os clusters 1 e 2 apresentaram maior similaridade entre si ( $S_{SM}$  0,95), sendo a cepa ES31, representativa do cluster 3, com 0,86 de similaridade com os clusters principais (1 e 2). Os clusters 4 e 5 apresentaram similaridade entre si de 0,885, porém são altamente dissimilares com os demais clusters ( $S_{SM}$  = 0,40).

Tabela 9. Tabela de contingência para associação de dados do voluntário E.

		Genótipos						
		Frequência	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	Total fenótipos
Mutacínótipos	[00000]	1	2	0	0	0	3	
	[00040]	0	0	0	2	0	2	
	[00402]	2	6	1	1	1	11	
	[00442]	6	0	0	0	0	6	
	Total de clones	9	8	1	3	1	22	

\* C – Cluster do AP-PCR

Apesar do coeficiente de contingência ser baixo, de 73,84%, pode-se rejeitar a hipótese de nulidade ( $H_0$ ), pois  $p < 0,05$ . Existem fortes indícios de associação verdadeira entre os métodos de agrupamento empregados. Apesar do clone principal (representante do cluster 1) apresentar os 4 fenótipos mutacinogênicos, e o perfil mutacinogênico predominante [00402] ser representado por cepas dos 5 clusters genotípicos, observa-se melhor distribuição dos clones representativos dos clusters (3 e 5) dentro dos perfis obtidos, fenotipicamente.

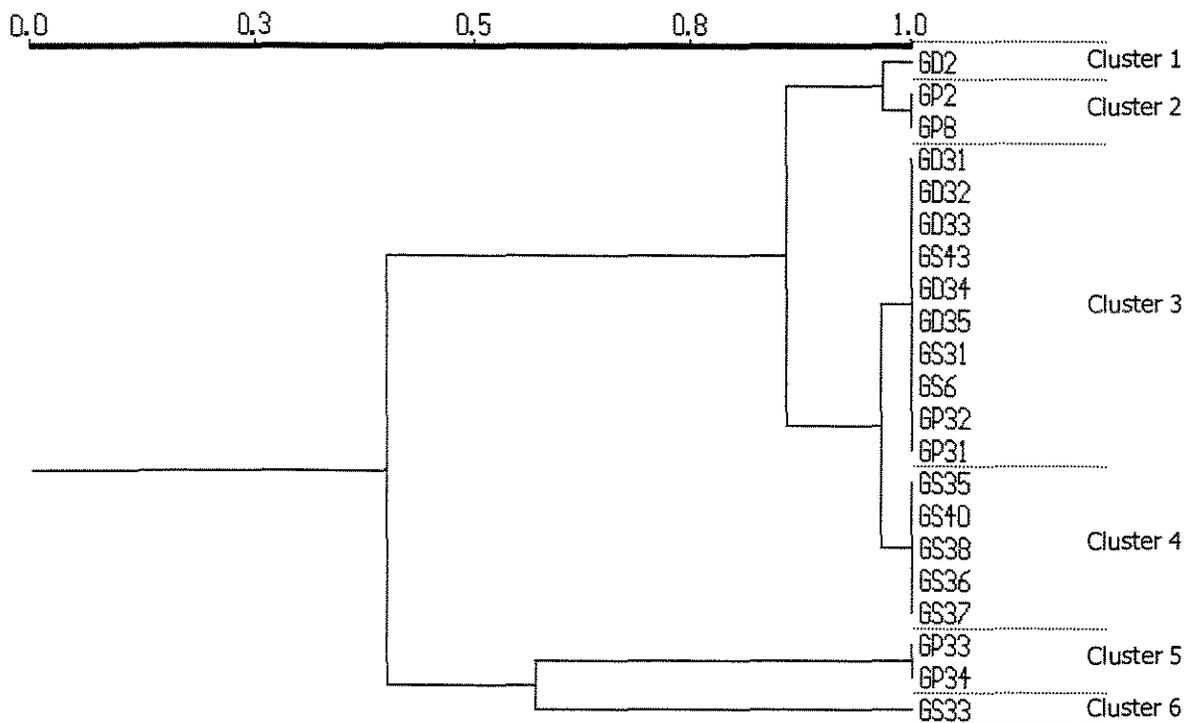


Figura15 - Dendrograma representativo do agrupamento genotípico de *Streptococcus mutans* presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário G, determinados por AP-PCR.

Os *S. mutans* isolados da cavidade bucal do voluntário G demonstrou polimorfismo genético de seis genótipos. O tipo clonal, com maior número de isolados (10/22), foi detectado nos três sítios estudados. A maioria dos isolados da saliva e da placa dental apresentou um tipo de colonização sítio-específica, ambas representadas por dois tipos de clones.

Observa-se maior similaridade entre os clusters 1, 2, 3 e 4 ( $S_{SM} \geq 0,89$ ). Os clusters 5 e 6 apresentam-se distantes dos demais ( $S_{SM} = 0,215$ ), e similares entre si de 58% ( $S_{SM} = 0,58$ ).

Tabela 10. Tabela de contingência para associação de dados do voluntário G.

		Genótipos						
		C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	Total fenótipos
Mutacínótipos	Frequência							
	[00000]	0	0	0	0	2	1	3
	[00040]	0	0	1	0	0	0	1
	[00402]	0	0	1	0	0	0	1
	[00442]	1	2	2	0	0	0	5
	[00456]	0	0	1	2	0	0	3
	[40054]	0	0	0	1	0	0	1
	[40442]	0	0	5	0	0	0	5
	[40456]	0	0	0	2	0	0	2
	Total de clones	1	2	10	5	2	1	21

\* C – Cluster do AP-PCR

O coeficiente de contingência entre os métodos de agrupamento fenotípico e genotípico foi de 83,37%, porém, pelo teste do  $G^2$ , não há associação verdadeira entre as técnicas empregadas ( $p > 0,05$ ). Observa-se que os clusters 3 e 4 apresentaram 5 e 3 fenótipos mutacinogênicos distintos, respectivamente. E dois perfis mutacinogênicos [00442] e [00456] distribuíram-se em 3 e 2 clusters diferentes, respectivamente.

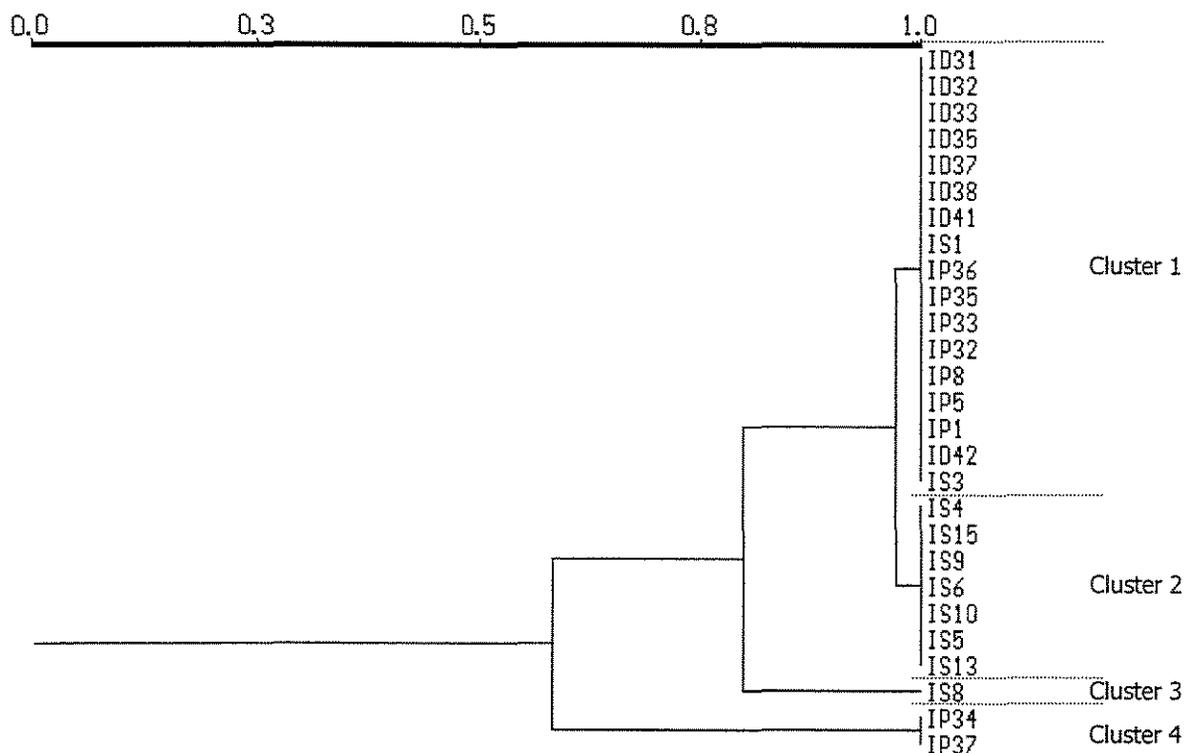


Figura 16 - Dendrograma representativo do agrupamento genotípico de *Streptococcus mutans* presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário I, determinados por AP-PCR.

Dentre os quatro tipos genéticos de *S. mutans*, isolados na cavidade bucal do voluntário I, o dominante numérico (18/28 – cluster 1) encontrou-se disperso nos diferentes sítios-bucais analisados. Um segundo grupo clonal (cluster 2), apresentou-se com localização sítio-específica na saliva e pouca dissimilaridade com o dominante numérico ( $S_{SM} = 0,985$ ). Os clusters 3 e 4 apresentaram similaridade de 0,84 e 0,60 com os clusters principais (1 e 2), respectivamente. A saliva demonstrou maior diversidade genética (3/5), seguida pela placa dental (2/5) e dorso de língua (1/5).

A TAB.11 demonstra os métodos de agrupamento das cepas de *S. mutans*, por Mutacinotipagem e AP-PCR em associação.

Tabela 11. Tabela de contingência para associação de dados do voluntário I.

		Genótipos				Total fenótipos
		C 1	C 2	C 3	C 4	
Mutacínótipos	Frequência					
	[00000]	1	0	0	0	1
	[00040]	3	1	0	1	5
	[00416]	3	0	0	0	3
	[00442]	6	0	0	0	6
	[00456]	4	6	1	1	12
	Total de clones	17	7	1	2	27

\* C – Cluster do AP-PCR

O grau de associação entre as duas técnicas foi de apenas 55,91%. O baixo coeficiente de contingência e o teste de  $G^2$  ( $p > 0,05$ ) confirmam os indícios de não associação verdadeira entre os dois métodos. Cepas dos clusters 1, 2 e 4 apresentaram mutacínótipo idêntico [00040], embora as cepas destes grupos genotípicos apresentassem entre si, 97% de similaridade.

As cepas do cluster 1, distribuíram-se entre os 5 perfis mutacinogênicos e o mutacínótipo [00456] foi detectado nos 4 clusters genotípicos obtidos por AP-PCR. O cluster 4, apesar da baixa similaridade genética com o cluster principal (cluster 1 –  $S_{SM} = 0,60$ ), apresentou dois perfis mutacinogênicos idênticos a de 7 cepas do cluster 1 (perfis [00040] e [00456]).

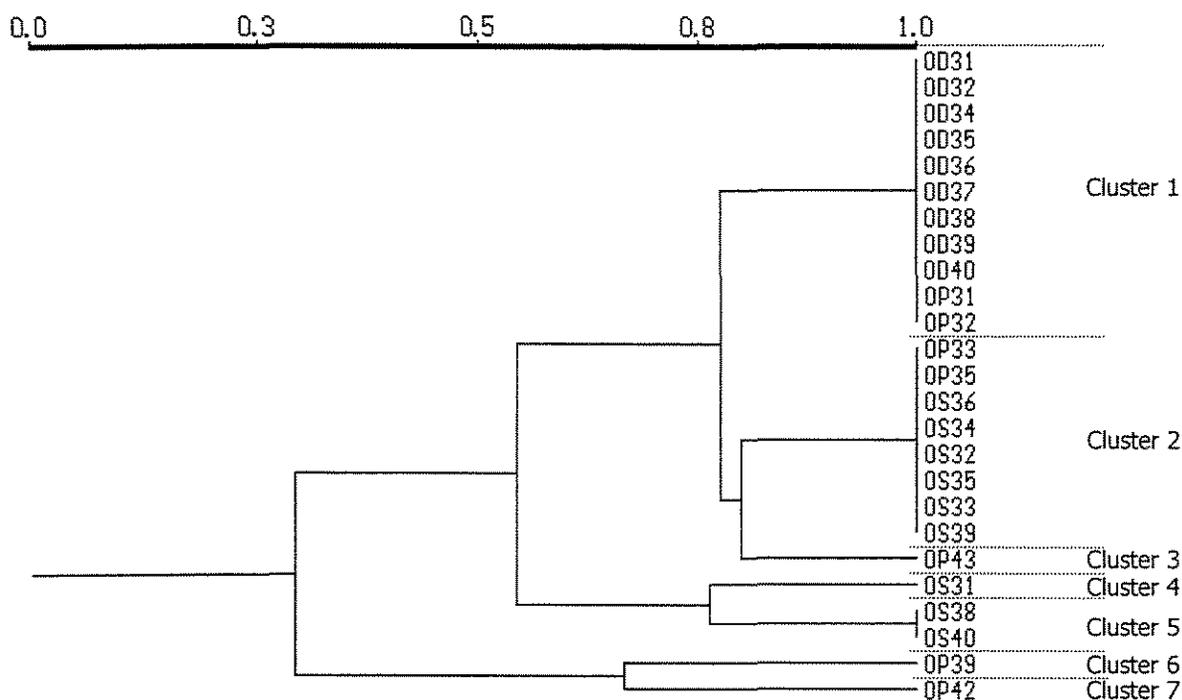


Figura 17 - Dendrograma representativo do agrupamento genotípico de *Streptococcus mutans* presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário O, determinados por AP-PCR.

Na cavidade bucal do voluntário O, foi possível detectar sete variantes genéticas de *S. mutans*. Dentre o extenso polimorfismo genético demonstrado, representativamente, na árvore de similaridade (FIG.17), destacam-se dois grupos de clones numericamente predominantes (clusters 1 e 2), distribuídos no dorso de língua (D) e placa dental (P), ou placa dental e saliva, respectivamente. Os clusters 2 e 3 apresentaram maior similaridade entre si ( $S_{SM} = 0,84$ ), sendo ambos 82% similares ao cluster principal (1). Já os clusters 6 e 7 apresentaram semelhança genética entre eles de 70% ( $S_{SM} = 0,70$ ) e alta dissimilaridade com os demais ( $S_{SM} = 0,33$ ).

Na TAB.12, observa-se a distribuição dos diferentes fenótipos mutacinogênicos em cada cluster genotípico obtidos pela técnica de AP-PCR. O coeficiente de contingência

entre os dois métodos de agrupamento empregados foi calculado através da tabela de contingência ilustrada a seguir. Apesar do alto grau de associação entre os métodos, demonstrado pelo coeficiente de contingência de 84,18%, o teste do  $G^2$  ( $p > 0,05$ ) não revelou, estatisticamente, associação verdadeira, entre os agrupamentos por fenotipagem e genotipagem.

Tabela 12. Tabela de contingência para associação de dados do voluntário O.

		Genótipos								
		Frequência	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 7	Total fenótipos
Mutacinótipos	[00000]	0	0	1	0	0	1	1	3	
	[00040]	0	1	0	0	1	0	0	2	
	[00060]	0	5	0	0	1	0	0	6	
	[00070]	0	1	0	1	0	0	0	2	
	[00442]	1	0	0	0	0	0	0	1	
	[00456]	6	0	0	0	0	0	0	6	
	[00476]	4	1	0	0	0	0	0	5	
	Total de clones	11	8	1	1	2	1	1	25	

\* C – Cluster do AP-PCR

Isto se deve a distribuição dos clusters 1, 2 e 5 em 2 a 4 fenótipos distintos. Além disso, cepas pertencentes a um mesmo grupo fenotípico ([00000], [00040], [00060] e [00070]), apresentaram-se com baixa similaridade genética ( $S_{SM}$  de 81% a 33%).

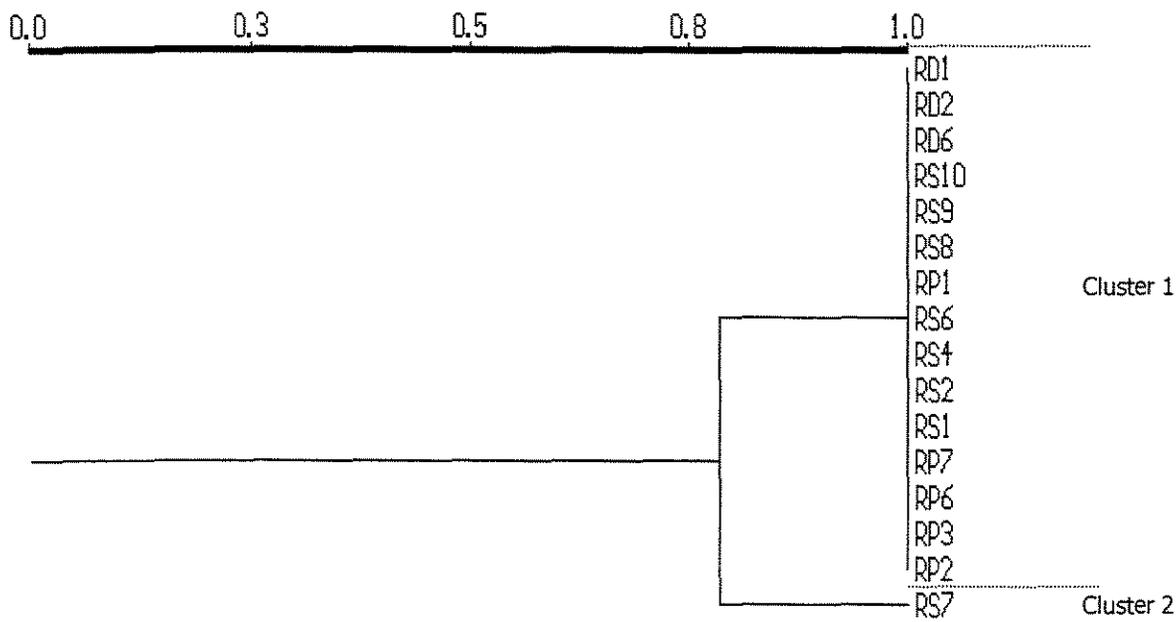


Figura 18 - Dendograma representativo do agrupamento genotípico de *Streptococcus mutans* presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário R, determinados por AP-PCR.

A árvore de similaridade da FIG.18 apresenta a formação de dois agrupamentos de isolados de *S. mutans* com similaridade mínima entre si de 82,5% ( $S_{SM} \geq 0,825$ ). O cluster representado por um maior número de isolados (16/18), encontra-se distribuído nos três sítios de isolamento. O outro genótipo (cluster 2) foi isolado somente da saliva, e apresentou similaridade com o cluster principal (cluster 1) de 82,5%.

Tabela 13. Tabela de contingência para associação de dados do voluntário R.

		Genótipos		Total fenótipos
		C 1	C 2	
Mutacínótipos	Frequência			
	[04457]	10	0	10
	[05457]	4	1	5
	[15557]	1	0	1
Total de clones		15	1	16

\* C – Cluster do AP-PCR

Na TAB.13, observa-se 2 grupos genotípicos associados com 3 fenotípicos. O cluster principal (cluster 1), distribui-se entre os 3 grupos mutacinogênicos, o que evidencia um baixo coeficiente de contingência (35,76%). O teste G2 ( $p > 0,05$ ), não comprova a associação verdadeira entre os métodos de agrupamento empregados.

As figuras a seguir (19-26) e tabelas (14-21) representam os dendogramas e as tabelas de contingência dos 8 voluntários cárie-ativos (C1-C9).

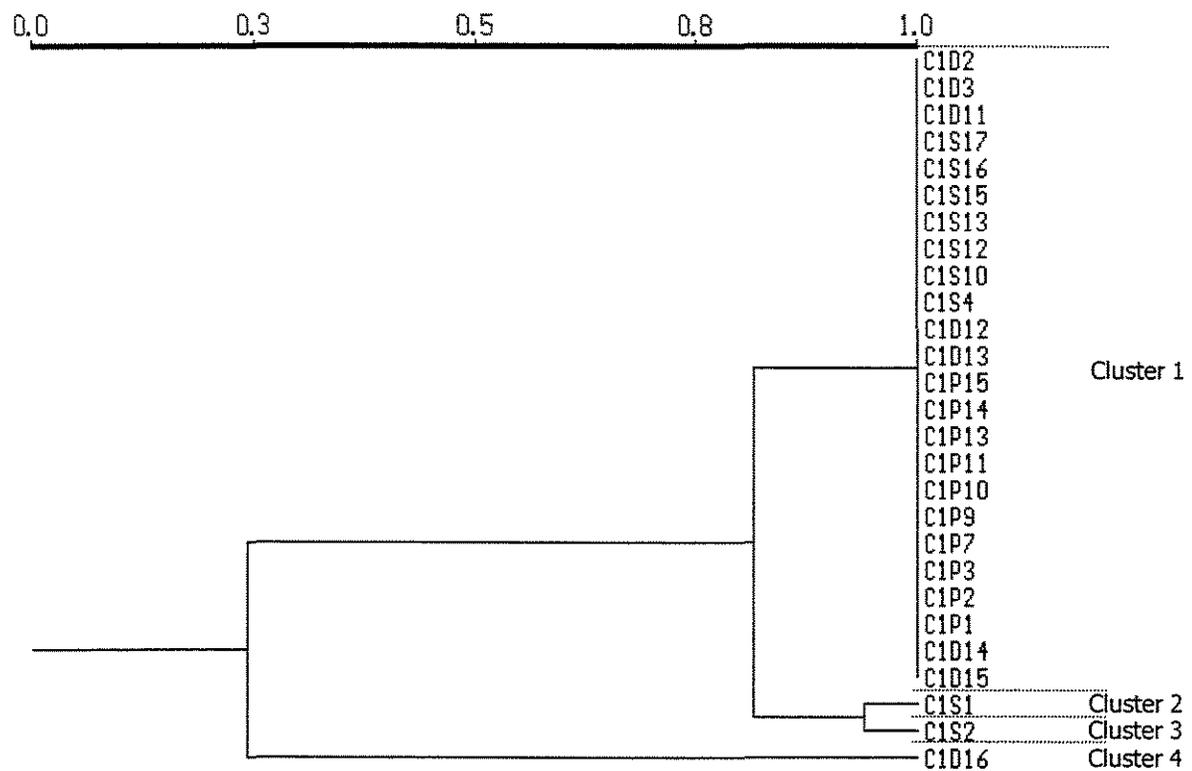


Figura 19 - Dendrograma representativo do agrupamento genotípico de *Streptococcus mutans* presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C1, determinado por AP-PCR.

O dendrograma da figura 19 representa os 4 tipos clonais isolados da cavidade bucal do voluntário com cárie C1. O genótipo predominante (cluster 1) foi isolado dos diferentes sítios analisados, e apresentou similaridade de 90% com os clusters 2 e 3 representados por cepas únicas isoladas da saliva, C1S1 e C1S2, respectivamente. O cluster 4, representado

pela cepa C1D16, isolada do dorso de língua, apresentou-se distante geneticamente dos clusters supracitados ( $S_{SM} = 0,29$ ).

Tabela 14. Tabela de contingência para associação de dados do voluntário C1.

		Genótipos				Total fenótipos
		C 1	C 2	C 3	C 4	
Mutacinótipos	Frequência					
	[00000]	1	0	0	1	2
	[00010]	1	0	0	0	1
	[00014]	3	0	0	0	3
	[00054]	7	0	0	0	7
	[00416]	5	1	0	0	6
	[00456]	7	0	1	0	8
	Total de clones	24	1	1	1	27

\* C – Cluster do AP-PCR

Neste caso o coeficiente de contingência foi de 64,16% e o teste do  $G^2$  não revelou, estatisticamente, associação entre os agrupamentos fenotípico e genotípico ( $p > 0,05$ ). O cluster principal representado por 24 cepas (cluster 1), apresentou os 6 diferentes perfis mutacinogênicos.

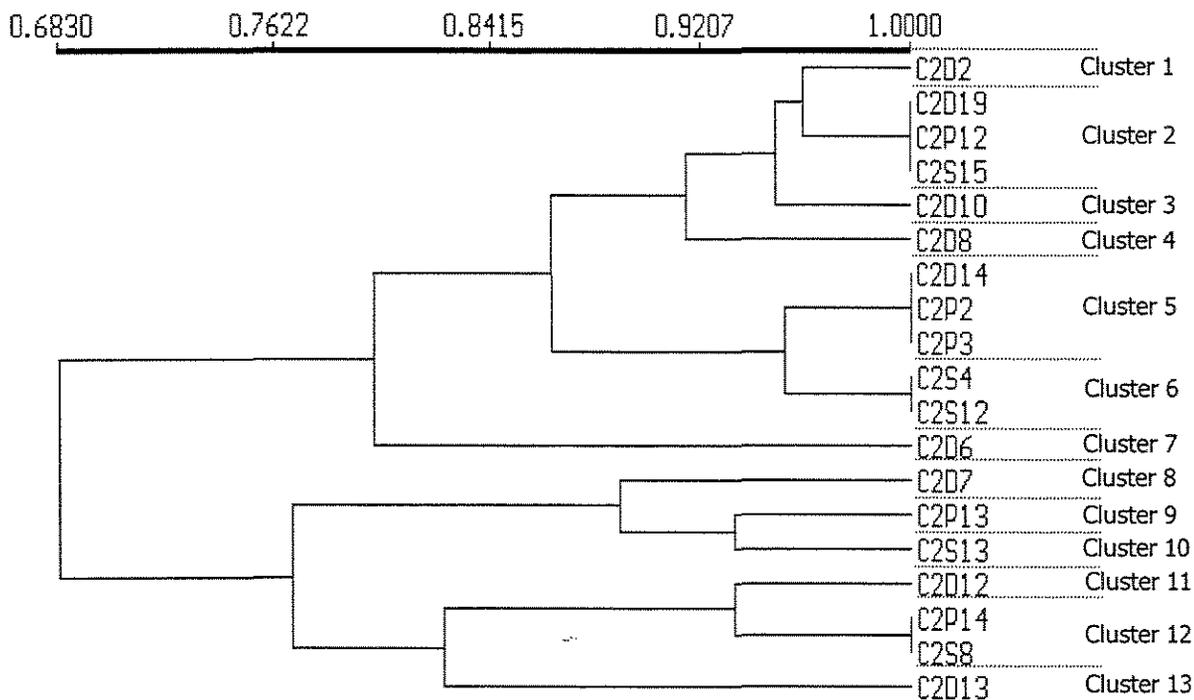


Figura 20 - Dendrograma representativo do agrupamento genotípico de *Streptococcus mutans* presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C2, determinado por AP-PCR.

Grande biodiversidade genética pode ser observada entre os *S. mutans* isolados da cavidade bucal do voluntário C2. As similaridades variaram de 0,68 a 0,96, aproximadamente.

Tabela 15. Tabela de contingência para associação de dados do voluntário C2.

		Genótipos													
		C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 7	C 8	C 9	C 10	C 11	C 12	C 13	Total fenótipos
Mutacínótipos	[00000]	0	2	0	1	0	1	1	0	1	1	0	2	0	9
	[00014]	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
	[00436]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	[00462]	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	[00476]	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3
	[77777]	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	3
Total de clones		1	3	1	1	2	3	1	1	1	1	1	2	1	19

\* C – Cluster do AP-PCR

Na TAB.15, observa-se a distribuição de 6 mutacínótipos em 13 genótipos determinados pela AP-PCR. O coeficiente de contingência foi de 89,36% e o valor de  $p > 0,05$  para o teste  $G^2$ . Nove cepas de diferentes genótipos tiveram perfil fenotípico de cepa não produtora de mutacina contra as indicadoras utilizadas no teste (perfil [00000]). Estatisticamente, os agrupamentos realizados a partir da Mutacinotipagem e AP-PCR não tiveram associação verdadeira, mesmo que o grau de associação entre elas fosse relativamente alto (89,36%).

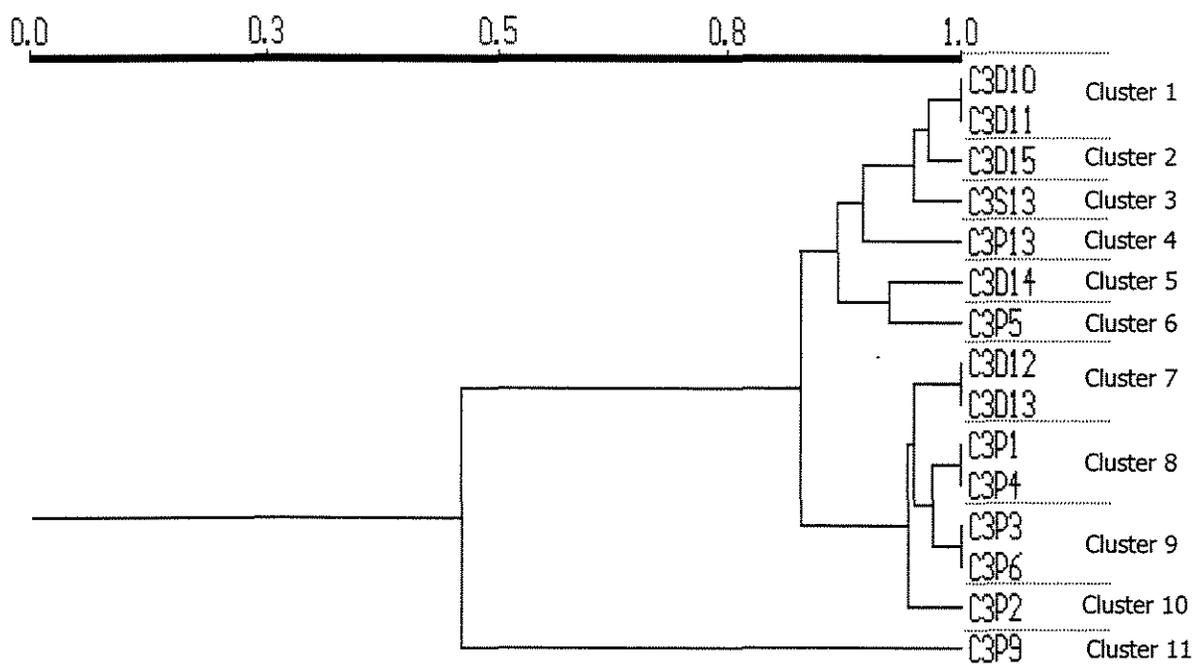


Figura 21 - Dendrograma representativo do agrupamento genotípico de *Streptococcus mutans* presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C3, determinado por AP-PCR.

A FIG.21, demonstra 11 clusters genéticos de *S. mutans* distintos, isolados da cavidade bucal do voluntário C3. Apesar da grande diversidade genética, observa-se entre os clusters de 1 a 10, alta similaridade entre eles ( $S_{SM} \geq 0,86$ ). A única exceção, o cluster

11, representado por um único isolado da placa dental, C3P9, apresentou apenas 47% de semelhança genética com os demais clusters ( $S_{SM} = 0,47$ ).

Tabela 16. Tabela de contingência para associação de dados do voluntário G.

		Genótipos									
		C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 7	C 8	C 9	Total fenótipos
Mutacínótipos	Frequência										
	[00000]	2	1	0	0	0	0	0	0	0	3
	[00001]	1	0	0	6	1	0	1	0	0	9
	[00020]	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2
	[10001]	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
	[40000]	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	[40402]	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	[50001]	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Total de clones	4	2	1	7	1	1	1	1	1	19	

\* C – Cluster do AP-PCR

O grau de associação entre a Mutacínótipagem e a AP-PCR foi de 89,07%, mas estatisticamente, o teste do  $G^2$  não confirmou esta associação ( $p > 0,05$ ). Nota-se que clusters 1 e 2, genótipos idênticos apresentaram-se com perfis de produção de mutacinas distintos. E 4 dos 7 fenótipos mutacínogênicos, distribuíram-se em 2 a 4 clusters genotípicos diferentes.

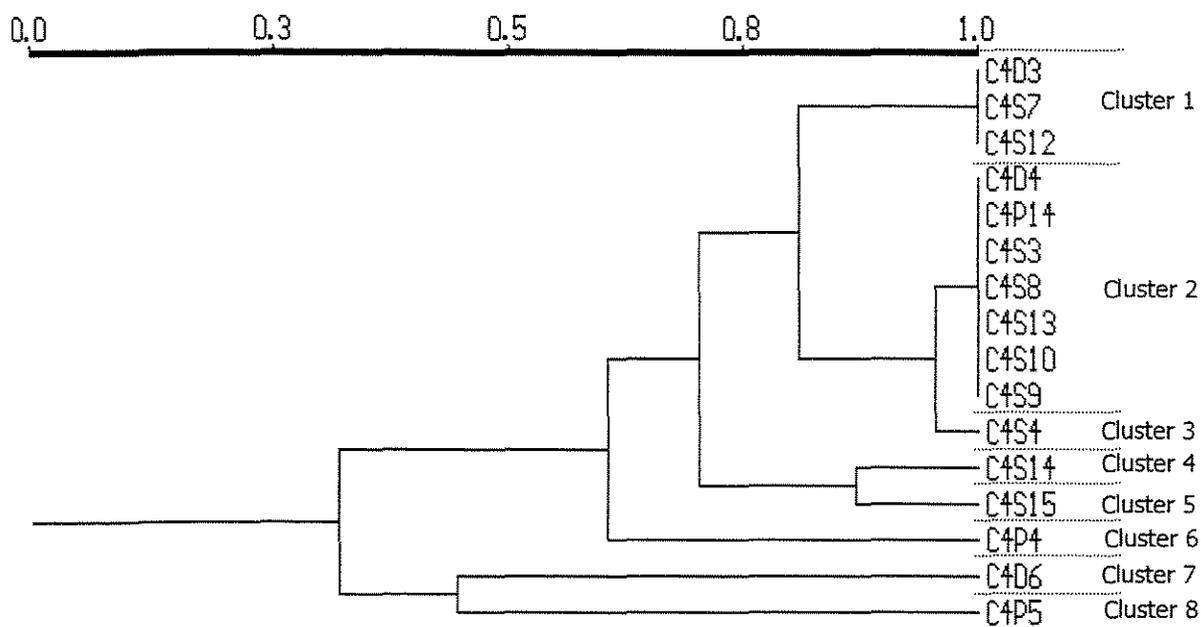


Figura 22 - Dendrograma representativo do agrupamento genotípico de *Streptococcus mutans* presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C4, determinados por AP-PCR.

O grau de similaridade entre as cepas de *S. mutans* isoladas da cavidade bucal do voluntário C4, variou de 0,35 a 0,96, demonstrando alto dimorfismo genético da espécie entre os 8 genótipos distintos detectados neste indivíduo.

Tabela 17. Tabela de contingência para associação de dados do voluntário C4.

		Genótipos									
Mutacínótipos		Frequência	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 7	C 8	Total fenótipos
	[00000]	6	1	3	0	1	0	0	0	0	11
	[00024]	1	0	0	0	0	1	0	1	1	3
	[04000]	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	[20000]	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
	Total de clones	7	1	3	1	1	1	1	1	1	16

\* C – Cluster do AP-PCR

A TAB.17 ilustra 8 clusters genotípicos obtidos por AP-PCR e 4 perfis fenotípicos obtidos através da Mutacínótipagem. Apesar do alto coeficiente de contingência (85,15%), não houve associação verdadeira entre os agrupamentos, estatisticamente ( $p > 0,05$ ). Os

padrões fenotípicos [00000] e [00024] distribuíram-se em 4 e 3 clusters genéticos distintos, respectivamente.

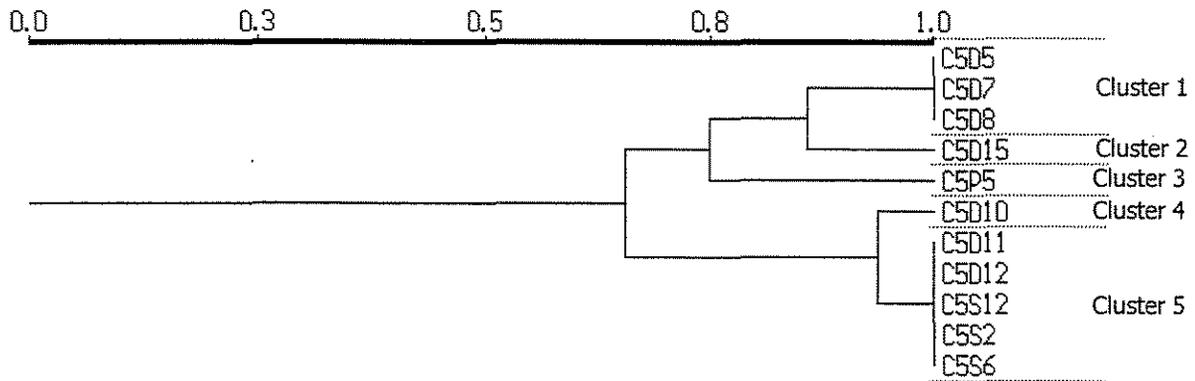


Figura 23 - Dendrograma representativo do agrupamento genotípico de *Streptococcus mutans* presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C5, determinados por AP-PCR.

O indivíduo C5 apresentou 5 genótipos distintos de *S. mutans*, com dimorfismo genético de até 32%. A maior semelhança genética encontrada, foi entre os clusters 4 e 5 ( $S_{SM} = 0,95$ ), seguida pelos clusters 1 e 2 ( $S_{SM} = 0,89$ ), respectivamente. Os clusters 4 e 5, com 95% de similaridade entre si, distanciam-se dos demais, em 32% ( $S_{SM} = 0,68$ ).

Tabela 18. Tabela de contingência para associação de dados do voluntário C5.

		Genótipos					Total fenótipos
		C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	
Mutacínótipos	Frequência	2	1	1	0	0	4
	[00060]	2	1	1	0	0	4
	[00402]	1	0	0	0	0	1
	[62230]	0	0	0	1	0	1
	[77723]	0	0	0	0	2	2
	[77777]	0	0	0	0	3	3
Total de dones		3	1	1	1	5	11

\* C – Cluster do AP-PCR

Os clusters 1 e 5 apresentaram 2 fenótipos distintos cada um, e o mutacínótipo [00060] foi comum para cepas de clusters diferentes (clusters 1, 2 e 3). A aplicação de teste

$G^2$ , não revelou associação verdadeira entre os métodos de agrupamento fenotípico e genotípico ( $p > 0,05$ ), mesmo sendo alto o coeficiente de contingência (82,72%).

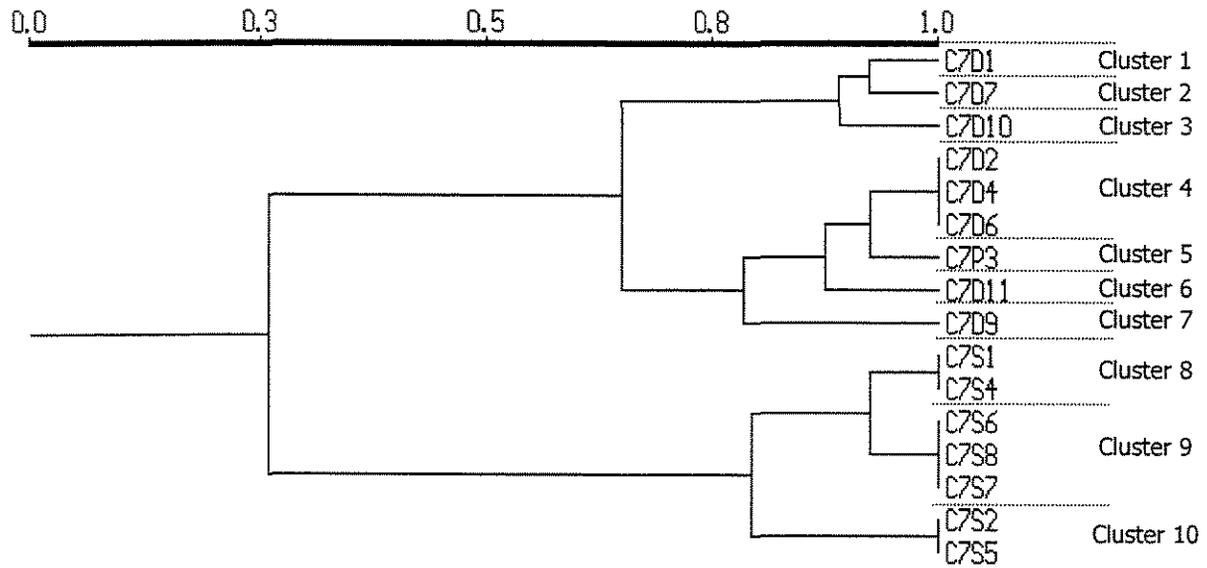


Figura24: Dendrograma representativo do agrupamento genotípico de *Streptococcus mutans* presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C7, determinados por AP-PCR.

Além da grande diversidade genética de *S. mutans* encontrada na cavidade bucal do voluntário C7, observa-se um considerável dimorfismo genético da espécie variando de 30% a 94%. A maioria dos clusters (de 1 a 7) apresentou grau de similaridade entre eles de 0,84 a 0,94, sendo os clusters 8, 9 e 10, os que apresentaram maiores dimorfismos genéticos (até 70% de dissimilaridade) em relação aos clusters mais similares, de 1 a 7.

A seguir, observa-se a tabela de contingência para associação de dados dos métodos de agrupamento utilizados (TAB.19). Na cavidade bucal do voluntário do indivíduo C7, as cepas de *S. mutans* foram agrupadas genotipicamente em 10 grupos, e fenotipicamente, em 6 grupos ou mutacinótipos.

O coeficiente de contingência, neste caso, foi de 88,92% e, estatisticamente, pelo teste  $G^2$ , não se verificou a associação verdadeira entre as técnicas ( $p > 0,05$ ).

Tabela 19. Tabela de contingência para associação de dados do voluntário C7.

		Genótipos										
		C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 7	C 8	C 9	C 10	Total fenótipos
Mutacिनótipos	Frequência	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	4
	[00000]	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	4
	[00020]	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	[00423]	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	3
	[04020]	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2
	[04422]	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
	[04423]	1	1	1	3	1	1	1	2	3	2	16
Total de dones												

\* C – Cluster do AP-PCR

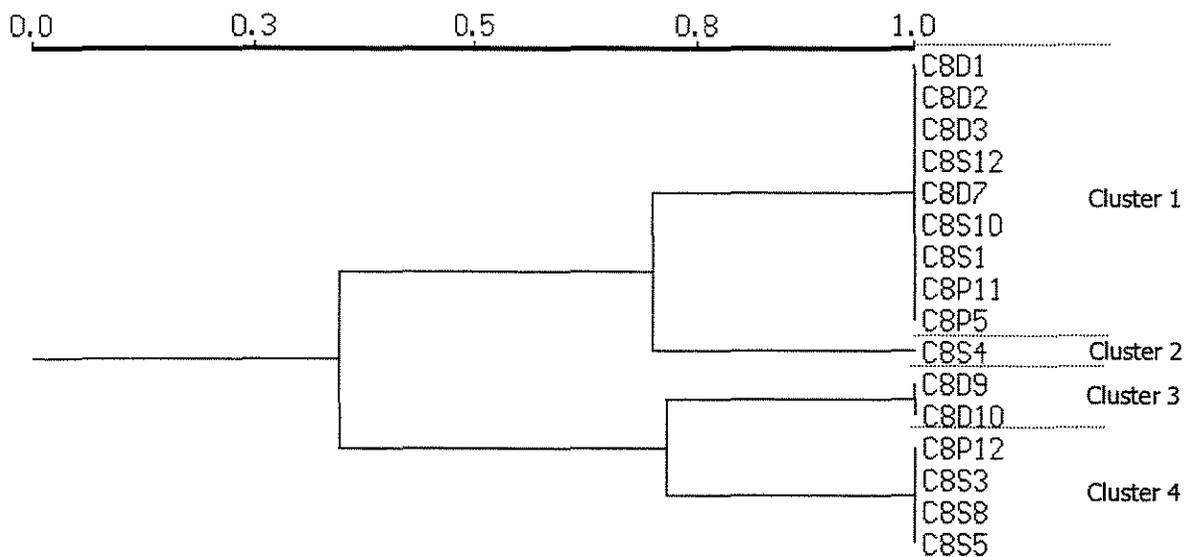


Figura 25 - Dendrograma representativo do agrupamento genotípico de *Streptococcus mutans* presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C8, determinados por AP-PCR.

O voluntário C8 apresentou baixa diversidade e alto dimorfismo genético de *S. mutans*. Os clusters 3 e 4 apresentaram maior grau de proximidade genética, com 76% de

similaridade seguido pelos clusters 1 e 2 com 72% de similaridade entre eles. Porém, os clusters 1/2 e 3/4 possuem grande dissimilaridade entre si ( $S_{SM} = 0,37$ ).

O agrupamento fenotípico e genotípico das cepas de *S. mutans* do voluntário C8 estão relacionados a seguir, na tabela de contingência (TAB.20).

Tabela 20. Tabela de contingência para associação de dados do voluntário C8.

		Genótipos				
		C 1	C 2	C 3	C 4	Total fenótipos
Mutacínótipos	Frequência					
	[00000]	0	1	1	1	3
	[20020]	0	0	0	1	1
	[22024]	0	0	0	1	1
	[22420]	1	0	0	0	1
	[64420]	6	0	0	1	7
	[77777]	2	0	1	0	3
Total de clones	9	1	2	4	16	

\* C – Cluster do AP-PCR

O coeficiente de contingência foi de apenas 72,63%. Genótipos idênticos dos clusters 1 e 4 apresentaram-se distribuídos em 3 e 4 grupos fenotípicos, respectivamente. Genótipos distintos (de 2 a 3 clusters), com grande dissimilaridade genética, apresentaram perfis mutacinogênicos idênticos ([00000], [64420] e [77777]). O teste  $G^2$  não revelou associação verdadeira entre os métodos de agrupamento utilizados ( $p > 0,05$ ).

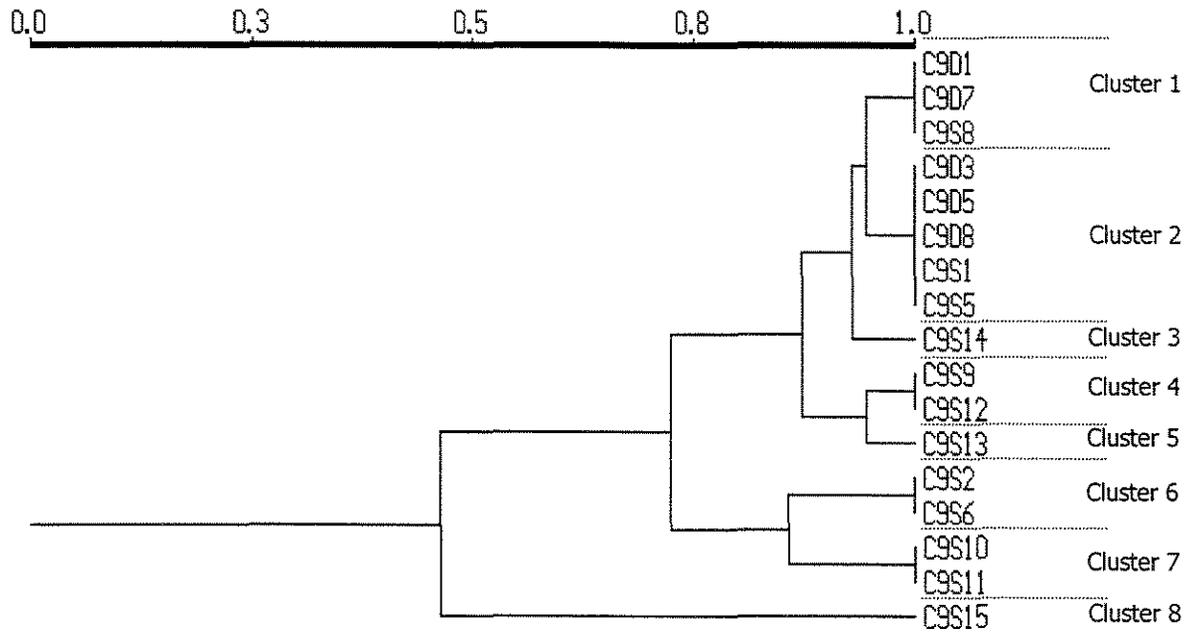


Figura 26 - Dendrograma representativo do agrupamento genotípico de *Streptococcus mutans* presentes simultaneamente na cavidade bucal do voluntário C9, determinados por AP-PCR.

O dendrograma acima demonstra 8 genótipos de *S. mutans* isolados da cavidade bucal do voluntário C9. Apesar da grande diversidade genotípica, o grau de similaridade da maioria dos clusters (de 1 a 7) variou de 0,89 a 0,96. Somente os clusters 8 (cepa C9D4) e 9 (cepa C9S15), apresentaram-se com maior dimorfismo genético em relação aos demais clusters analisados, com  $S_{SM} = 0,68$  e  $0,47$ , respectivamente.

As cepas de *S. mutans* isolados da cavidade bucal do voluntário C9, foram agrupadas genotipicamente em 8 grupos distintos e fenotipicamente em 9 grupos. A TAB. 21, demonstra a tabela de contingência formada para análise de associação entre os métodos de agrupamentos empregados. Genótipos idênticos de 4 clusters (1, 2, 4 e 7) apresentaram de 2 a 4 perfis mutacinogênicos distintos. E os perfis fenotípicos [00402], [00416] e [00456] foram comumente detectados em 2 a 4 clusters geneticamente

diferenciados. Estatisticamente, pelo teste  $G^2$  não houve associação entre os agrupamentos ( $p > 0,05$ ).

Tabela 21. Tabela de contingência para associação de dados do voluntário C9.

		Genótipos									
		C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 7	C 8	Total fenótipos	
Mutacínótipos	Frequência	[00014]	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	[00402]	0	0	0	0	1	0	0	1	2	
	[00416]	1	1	0	0	0	0	1	0	3	
	[00456]	1	0	0	1	0	2	1	0	5	
	[16577]	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
	[30416]	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
	[57577]	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
	[77577]	0	2	0	0	0	0	0	0	2	
	[77677]	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
	Total de clones	3	5	1	2	1	2	2	1	17	

\* C – Cluster do AP-PCR

#### 5.2.4. Capacidade Discriminatória

Para analisar a capacidade de discriminação das técnicas de tipagem, utilizou-se a

$$\text{equação de Simpson: } D = 1 - \frac{1}{N \cdot (N - 1)} \sum_{j=1}^s x_j \cdot (x_j - 1)$$

Onde,  $s$  é o número de tipos encontrados,  $x_j$  é o número de cepas para cada tipo e  $N$  é o tamanho da amostra (número de cepas tipadas). O poder discriminatório pode ser definido, matematicamente, calculando-se a probabilidade com que duas cepas, escolhidas, aleatoriamente, de uma população de espécies não relacionadas, se distinguirão pelo método de tipagem empregado (GASTON & HUNTER, 1989).

A TAB.22 mostra os índices de discriminação obtidos para a Mutacínótipagem e AP-PCR. A técnica de AP-PCR apresentou maior poder discriminatório e menor proporção de cepas no tipo mais freqüente, em relação a Mutacínótipagem.

Tabela 22. Índices de Discriminação da AP-PCR e Mutacinotipagem de *S. mutans*.

Método de Tipagem	Número de tipos (genótipos/mutacinótipos)	(%) do tipo mais freqüente	Índice de Discriminação
AP-PCR	101	7,5	0,975
Mutacinotipagem	55	19,3	0,925

O índice de discriminação indica que se duas cepas escolhidas ao acaso, forem submetidas a Mutacinotipagem e a AP-PCR, provavelmente, serão diferentes em 92,5 e 97,5% das ocasiões, respectivamente.

Mesmo considerando a técnica de AP-PCR com maior capacidade discriminativa, os números de genótipos e fenótipos obtidos intra-indivíduo, para cada grupo, se aproximaram, de modo que não se obteve diferenças estatisticamente significativas entre as médias do número de perfis genotípicos e mutacinogênicos (FIGURAS 27 e28).

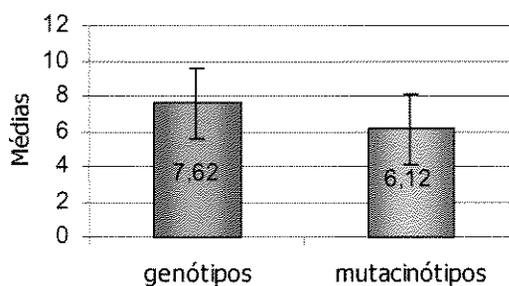


Figura 27 – Gráfico das médias dos números de genótipos obtidos AP-PCR e mutacinótipos do grupo cárie-ativo.

O teste t Student não revelou indícios de que a média do número de clones formados através do AP-PCR seja diferente estatisticamente da média do número de fenótipos formados através da Mutacinotipagem ( $p = 0,059$ ), no grupo cárie-ativo.

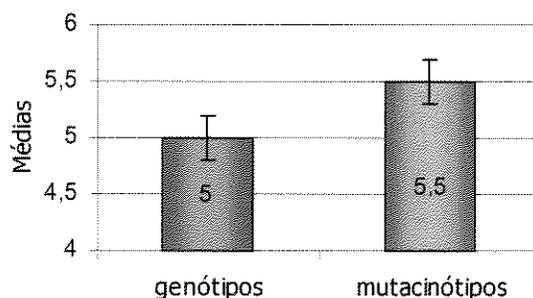


Figura 28 – Gráfico das médias dos números de genótipos obtidos por AP-PCR e mutacinótipos do grupo livre de cárie.

O teste t Student não revela indícios de que a média do número de clones formados através do AP-PCR seja diferente estatisticamente da média do número de fenótipos formados através da Mutacinotipagem ( $p = 0,90$ ), no grupo livre de cárie.

### 5.3. Análise Adicional

A TAB.23 mostra o número de isolados e de genótipos encontrados por sítio analisado.

Tabela 23. Número de isolados e de genótipos encontrados por sítio.

	Sítio			Total
	Saliva (S)	Placa Dental (P)	Dorso de Língua (D)	
Nº de isolados	121	83	115	319
Nº de genótipos	50	37	48	101

Nenhum sítio mostrou-se representativo de todos os genótipos da cavidade bucal. O teste Qui-quadrado, aplicado para analisar 2 sítios distintos (SxP; SxD; PxD), não comprovou, estatisticamente, a significância do número de genótipos/sítio bem como o número de isolados/sítio ( $p > 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Dentro de um ecossistema, o desenvolvimento da comunidade geralmente envolve uma sucessão de populações. Os primeiros colonizadores da cavidade bucal são *S. mitis* biovar 1, *S. oralis* e *S. salivarius*, estes microrganismos pioneiros modificam o habitat, e como resultado, novas populações podem se desenvolver. É um processo contínuo, onde a diversidade e a complexidade da comunidade microbiana aumenta e só termina quando atinge um clímax ou homeostase (MARCOTTE & LAVOIE, 1998).

A competição e os mecanismos antagônicos entre bactérias indígenas ajuda a manter o balanço ecológico prevenindo o crescimento de algumas bactérias residentes ou a estabilidade de bactérias exógenas (MARSH, 1989; THEILADE, 1990). A competição por receptores de adesão, por alimentos (McKEE *et al.*, 1985; van der HOEVEN *et al.*, 1985), e a produção de substâncias inibitórias, como as bacteriocinas, estão entre os mecanismos envolvidos na redução da colonização e do crescimento microbiano (MARCOTTE & LAVOIE, 1998).

A freqüência de produção de mutacinas por *S. mutans* pode variar de 70 a 100% (BERKOWITZ & JORDAN, 1975 - 99,1%; HAMADA & OOSHIMA, 1975a - 75%; ROGERS, 1976 - 70%; BERKOWITZ & JONES, 1985 - 100%; GRÖNROOS *et al.*, 1998 - 88%). No presente trabalho, 79,62% (254/319) das cepas de *S. mutans* analisadas mostraram atividade mutacinogênica contra pelo menos uma das 13 cepas indicadoras. Os diferentes valores da freqüência de produção detectados, devem-se, provavelmente, às

diferenças nas condições de realização dos testes e ao uso de diferentes cepas indicadoras (ROGERS, 1976).

Segundo KELSTRUP & GIBBONS (1969 a, b) e ROGERS (1974), o papel das bacteriocinas na ecologia microbiana é limitado devido a sua rápida inativação através de numerosas proteinases salivares, porém muitos experimentos *in vivo*, em humanos e em animais, foram bem sucedidos na tentativa de implantar cepas altamente mutacinogênicas na cavidade bucal, conferindo a vantagem ecológica dessas substâncias (van der HOEVEN *et al.*, 1979; HILLMAN *et al.*, 1984, 1985, 1987 e 2000). Além disso, GRÖNROOS *et al.* (1998) observaram maior transmissibilidade maternal de *S. mutans* com grande espectro de ação antimicrobiano em crianças de 18 a 36 meses de idade, evidenciando a importância da mutacinogênese na colonização primária desta espécie.

Cepas não mutacinogênicas (perfil [00000]), nas condições testadas, foram numericamente predominantes em 2 voluntários cárie-ativos e 2 livres de cárie. ROGERS (1974) verificou a coexistência de cepas de *S. mutans* produtoras e sensíveis num mesmo nicho da cavidade bucal, revelando as limitações das mutacinas *in vivo*.

Uma possível explicação para o predomínio de cepas não produtoras de bacteriocinas, em uma população microbiana, foi proposta por CHAO & LEVIN (1981) que demonstraram que uma pequena população de cepas de *Escherichia coli* produtoras de colicina não foi capaz de invadir uma população estável de células sensíveis, pois as fontes nutricionais disponíveis para as células produtoras, num ambiente natural, estão distribuídas aleatoriamente, diferentemente da placa com ágar, e o alto custo energético para a síntese de antimicrobianos naturais pode ocasionar a letalidade da célula produtora. Segundo estes autores uma população de cepas produtoras pode tornar-se extinta diante da pressão

ecológica do ambiente natural, justificando a maior frequência de isolamento de células sensíveis ou não produtoras, porém estáveis.

A detecção de cepas produtoras de mutacinas *in vitro* pode ter sido limitada porque somente um tipo de meio de cultura (TSA) e um grupo de condições de incubação (10% de CO<sub>2</sub>, a 37°C por 24 horas) foram empregados. Segundo ROGERS (1976), diferentes perfis mutacinogênicos podem ser obtidos dependendo das condições de cultura da técnica. Além disso, o ambiente da cavidade bucal não é reproduzível em laboratório, e diante da pressão populacional (ou ecológica) deste meio, cepas não produtoras de mutacinas *in vitro*, podem expressar a produção destas substâncias inibitórias *in vivo*.

As cepas não mutacinogênicas, mais frequentemente isoladas neste estudo, poderiam ser portadoras de genes de imunidade às bacteriocinas, adquiridos vertical ou horizontalmente. Segundo AJDIC *et al.*, (2002) os genes de imunidade transferidos, representam fragmentos de um cluster gênico de bacteriocinas, e podem promover imunidade às substâncias antimicrobianas sintetizadas por outras espécies, geneticamente semelhantes.

STEIN *et al.* (2003) promoveram a expressão de genes de imunidade à nisina, em células de *Bacillus subtilis* sensíveis, através da integração de diferentes combinações dos genes de imunidade *nisl* e *nisFEG*, de *Lactococcus lactis*. Observou-se que o nível de tolerância a nisina, adquirido pelo mutante de *Bacillus subtilis*, foi de 30% em relação ao nível de imunidade de uma cepa de *Lactococcus lactis* produtora de nisina, sugerindo que a expressão dos genes de imunidade, na célula receptora, pode promover determinada resistência a respectiva bacteriocina. Assim como a produção de bacteriocinas pode influenciar na estabilidade de determinada espécie em seu nicho ecológico, a expressão de

genes de imunidade aos diferentes antimicrobianos naturais também pode ter importante papel na ecologia e sucessão microbiana, sendo este um campo promissor em estudos ecológicos.

Segundo GRÖNROOS *et al.* (1998), a atividade bacteriocinogênica de *S. mutans* poderia aumentar a proporção desta espécie na placa dental, contribuindo, conseqüentemente, com o aumento do risco de cárie, entretanto, as informações sobre produção de mutacinas e risco de cárie são restritas e contraditórias na literatura. Enquanto ALALUUSUA *et al.* (1991) não encontraram relação positiva entre a atividade mutacinogênica e a contagem de *S. mutans* da placa dental (risco de cárie), FABIO *et al.* (1987) demonstraram associação positiva entre a proporção de *S. mutans*/estreptococos orais e o potencial bacteriocinogênico.

Diante das limitadas informações, propôs-se neste estudo analisar a síntese de mutacinas por *S. mutans* isolados do grupo de indivíduos com e sem cárie, e foi possível observar que os perfis de produção destas substâncias, entre os 2 grupos analisados, diferiram em relação ao antagonismo contra as diferentes cepas indicadoras.

Enquanto os *S. mutans* isolados de voluntários com cárie apresentaram atividade mutacinogênica de amplo espectro sobre a maioria das cepas indicadoras, os isolados de *S. mutans*, de indivíduos livres de cárie, apresentaram-se com baixo potencial mutacinogênico para os estreptococos cariogênicos (*S. mutans* e *S. sobrinus*) e ampla atividade inibitória contra os estreptococos grupo mitis, principalmente para o *S. oralis* e *S. sanguinis*.

Estes resultados podem estar relacionados com os diferentes padrões de colonização de indivíduos cárie-ativos e livres de cárie. Segundo achados de NYVAD & KILIAN (1990) e QI *et al.* (2001), indivíduos com cárie são mais facilmente infectados e

colonizados por estreptococos cariogênicos, diferenciando-se de indivíduos livres de cárie, que possuem uma colonização mais persistente de *S. sanguinis* e outros estreptococos grupo mitis, justificando, talvez, a atividade mutacinogênica mais intensa contra os colonizadores predominantes nestas populações.

Teoricamente, inibindo seus competidores potenciais, os isolados de *S. mutans* teriam uma colonização bem sucedida, através da aquisição da hegemonia nutricional ou de receptores de superfície específicos para sua adesão. Diante da composição da microbiota oral diferenciada de indivíduos com e sem cárie, o processo seletivo de *S. mutans* talvez priorizaria a colonização de cepas produtoras de mutacinas contra espécies mais prevalentes nestas populações. Uma vez que a produção de mutacinas pode favorecer a espécie produtora em ambientes naturais e complexos como a placa dental (BALAKRISHNAN *et al.*, 2002), sugere-se que a substância produzida seja direcionada para a inibição de espécies mais prevalentes, pela própria economia celular bacteriana.

Para QI *et al.*(2001), a interação antagônica entre *S. mutans* e *S. mitis* ocorre por ação antibacteriana da mutacina IV, altamente inibitória para o grupo mitis. Segundo estes autores, o processo de colonização do *S. mutans* iniciaria com a produção de mutacina IV por células planctônicas da saliva. Após a redução do número de colonizadores primários, na superfície dental, o *S. mutans* passaria a colonizá-la e uma vez no biofilme, poderia inibir outros competidores potenciais, através da produção de mutacina I. Tal hipótese da interação entre mutacinas pode ser consolidada pelo próprio ambiente bucal, altamente composto por uma grande diversidade de substâncias e espécies bacterianas que agem sinérgica ou antagonicamente.

A interação reversa entre *S. mutans* e *S. sanguinis* não se restringe apenas à capacidade de produção de mutacinas. Sabe-se que os primeiros colonizadores das superfícies do esmalte predominam até a queda de pH na placa dental, devido à fermentação de açúcares. A redução do pH e da população de colonizadores primários favorecem a implantação e a colonização de *S. mutans* (microrganismos ácido tolerantes ou acidúricos) e, conseqüentemente, aumenta o risco de cárie (ANDERSON *et al.*, 1995).

Além dos estudos ecológicos, a bacteriocinotipagem pode ser empregada na classificação taxonômica de bactérias. Visando obter resultados mais precisos na bacteriocinotipagem de *S. mutans*, os isolados também foram submetidos à técnica de AP-PCR. A média do coeficiente de contingência ou grau de associação entre o agrupamento fenotípico e genotípico determinados pela Mutacinotipagem e pela AP-PCR, respectivamente, foi de 77,38%. Em nenhum dos 16 voluntários analisados, o agrupamento fenotípico de isolados de *S. mutans* foi idêntico ao genotípico. Cepas geneticamente iguais não possuíam o mesmo perfil mutacinogênico traçado pela Mutacinotipagem, assim como genótipos distintos foram agrupados como perfis fenotípicos idênticos.

Vários fatores podem ter influenciado nestes resultados contraditórios, por exemplo, a utilização de sobrenadantes de cultura ao invés de bacteriocinas previamente purificadas, segundo VINCENT *et al.* (1998), gera um perfil bacteriocinogênico limitado, pois uma única cepa pode ser capaz de sintetizar mais de um tipo de bacteriocina.

Diante da grande diversidade das mutacinas sintetizadas por *S. mutans*, os “primers” arbitrários OPA-02 e OPA-13, não foram capazes de detectar o polimorfismo de regiões gênicas responsáveis pela expressão de antimicrobianos naturais, tal afirmação

baseia-se em genótipos idênticos com padrões fenotípicos distintos. Provavelmente, com a utilização de outros “*primers*” arbitrários poder-se-ia obter resultados mais precisos.

Outra possível explicação baseia-se na fragmentação de grandes segmentos de DNA, provavelmente do segmento relacionado com a síntese de mutacinas, durante o procedimento de extração de DNA. Segundo LI & CAUFIELD (1998), a perda destes segmentos ocasiona a ausência de *amplicons* maiores que 1,8 kb.

ALI *et al.* (2002), baseando-se nas seqüências de aminoácidos de 4 mutacinas (B-Ny266/1140/mutacina III e mutacina II) construíram “*primers*” específicos de DNA para detecção de genes similares em cepas de *S. mutans*, fenotipicamente classificadas em 24 grupos de A a X, por MORENCY *et al.*, em 1995. Embora, somente 6 das 24 cepas de *S. mutans* testadas tenham demonstrado homologia genética entre as mutacinas já descritas, fenotipicamente, elas demonstraram espectros de inibição e imunidade distintos. Segundo de VOS *et al.* (1993), a diferença no padrão de produção de antimicrobianos homólogos, deve-se em parte, à difusão diferenciada das substâncias no meio de cultura. Por exemplo a Nisina A e sua bacteriocina homóloga, Nisina Z, diferem em um único aminoácido, mas os espectros de atividade têm somente 83% de similaridade (MORENCY *et al.*, 2001). Tais dados subsidiam a idéia de que os “*primers*” arbitrários OPA-02 e OPA-13 não são sensíveis na detecção de diferenças sutis entre bacteriocinas homólogas, porém fenotipicamente distintas.

BALAKRISHNAN *et al.* (2002) classificaram fenotipicamente 16 cepas de *S. mutans*, produtoras de mutacinas, em 4 grupos (A-D). A análise filogenética de cepas de *S. mutans* através de características genotípicas (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*) e fenotípicas (hidrólise da esculina, fermentação da amigdalina e o teste da  $\beta$ -hemolisina)

revelaram que os grupos de mutacinas estão associados com linhagens evolucionárias distintas da espécie, pois cepas do grupo D foram agrupadas com duas cepas não produtoras de mutacinas e duas do grupo A não foram geneticamente relacionadas.

Segundo BALAKRISHNAN *et al.* (2002), cepas de mesmo perfil fenotípico não relacionadas geneticamente suportam a hipótese de transferência horizontal de genes relacionados com a produção de bacteriocinas. Nesta tese, perfis mutacinogênicos idênticos também foram detectados em cepas filogeneticamente não relacionadas, quando analisados em relação aos resultados da AP-PCR.

Concordando com os achados de BALAKRISHNAN *et al.* (2002), algumas cepas produtoras de mutacinas foram incluídas no mesmo grupo filogenético de cepas não produtoras (perfil [00000]), sugerindo que mutações gênicas, indetectáveis pela técnica de AP-PCR, podem ter levado à perda da atividade inibitória.

Embora a técnica de AP-PCR não tenha demonstrado sensibilidade para diferenciar cepas produtoras e não produtoras de mutacinas, GRÖNROOS & ALALUUSUA (2000) e NASCIMENTO (2002) distingüiram cepas de *S. mutans* fermentadoras e não-fermentadoras de melibiose, através da obtenção de padrões de AP-PCR distintos. Estudos preliminares (USHIRO *et al.*, 1991; RUSSELL *et al.*, 1992) revelaram que cepas não fermentadoras de Melibiose apresentam grande deleção cromossomal do operon *msm*, responsável pela fermentação de vários açúcares como a melibiose.

A técnica de AP-PCR tem sido amplamente aplicada em estudos sobre a diversidade genotípica de isolados microbianos. Comumente, aceita-se que quaisquer polimorfismos observados entre espécies relacionadas, são produtos de modificações no pareamento das bases por mutações, deleções ou inserção de elementos genéticos.

Os resultados da análise da diversidade genotípica de *S. mutans*, intra-indivíduo, pela técnica de AP-PCR, revelou a multicolonização de 2 a 13 genótipos da espécie num mesmo indivíduo. Diferentes métodos genotípicos de tipagem, como MLEE e AP-PCR, aplicados em isolados clínicos de *S. mutans*, têm revelado a colonização de 1-10 genótipos de *S. mutans* distintos num mesmo indivíduo (ALALUSUUA *et al.*, 1996; GRÖNROOS & ALALUUSUA, 2000; ROSA, 2001; NASCIMENTO, 2002).

Para ALALUUSUA *et al.* (1996), quanto maior o número de isolados, maior o número de genótipos detectados, entretanto, esta relação não pode ser evidenciada na recente pesquisa, uma vez que o número de isolados não foi diretamente proporcional ao número de genótipos encontrados. Tais dados também foram obtidos por NASCIMENTO, 2002.

Analisando-se os dendogramas contruídos, a partir da análise dos padrões de AP-PCR, nota-se que um mesmo genótipo foi detectado em diferentes sítios, assim como num mesmo sítio foi possível isolar diferentes genótipos. Tais dados concordam com o estudo de EMANUELSSON (2001) sobre a distribuição, aquisição e estabilidade de *S. mutans* em famílias e sítios da cavidade bucal.

Nenhum dos sítios analisados (saliva, placa dental e dorso de língua) mostraram-se representativos de todos os genótipos da cavidade bucal. Estatisticamente, não se encontrou diferença significativa entre o número de genótipos encontrado por sítio (diversidade genotípica). Segundo GRÖNROOS & ALALUSUUA (2000), devido a colonização sítio específica de alguns clones de estreptococos grupo mutans, torna-se necessário coletar amostras de diferentes sítios da dentição, para uma análise representativa e qualitativa de microrganismos orais.

A técnica de AP-PCR apresentou maior capacidade discriminatória em relação a Mutacinotipagem. Os índices discriminatórios obtidos foram de 0,975 e 0,925, respectivamente. GRÖNROOS *et al.* (1998) também demonstraram menor capacidade discriminatória da Mutacinotipagem em relação a Ribotipagem de *S. mutans*, pois ribotipos diferentes não foram distinguidos pela técnica fenotípica.

Resultados contrastantes em métodos de tipagem, são frequentemente encontrados na literatura, sendo assim, importante analisar a diversidade de uma espécie através de associações de técnicas taxonômicas distintas (ALONSO *et al.*, 1993; GRÖNROOS *et al.*, 1998).

WANG *et al.* (1993) detectaram diferenças entre isolados de *E. coli* através do MLEE e AP-PCR. Enquanto o MLEE com 20 enzimas classificou 75 isolados em 15 grupos distintos, a técnica de AP-PCR utilizando 5 *primers* distinguiu 74 dos 75 isolados, demonstrando maiores variações inter-grupo do que intra-grupo do MLEE, bem como maior poder discriminatório.

Porém, SAARELA *et al.* (1996), analisando os ribotipos e os padrões de AP-PCR de 81 isolados de estreptococos grupo *mutans*, observaram que a capacidade discriminatória da Ribotipagem foi, sutilmente, superior a técnica de AP-PCR, mas ambas demonstraram heterogeneidade em 16 dos 19 indivíduos analisados, invalidando a aplicação destes métodos em estudos epidemiológicos.

Embora a Mutacinotipagem apresente algumas limitações e menor poder discriminatório como método de tipagem de *S. mutans*, os números de genótipos e fenótipos obtidos intra-indivíduo, para cada grupo, se aproximaram, de modo que não se

obteve diferenças estatisticamente significativas entre as médias do número de perfis genotípicos e mutacinogênicos

A comparação da diversidade fenotípica e genotípica de *S. mutans* entre indivíduos com e sem cárie foi um dos propósitos deste trabalho, pois existem poucas informações sobre o impacto da diversidade clonal de estreptococos grupo mutans e a severidade da cárie dental (BOWDEN *et al.*, 1997). ALALUSUUA *et al.*, (1996) detectaram maior diversidade genotípica de estreptococos cariogênicos em crianças cárie-ativas (cárie de mamadeira), através da Ribotipagem. Porém, KREULEN *et al.* (1997) não observaram os mesmos resultados aplicando a técnica de AP-PCR em isolados de *S. mutans*, demonstrando que em crianças cárie-ativas (cárie de mamadeira), ocorre seleção clonal de cepas potencialmente cariogênicas. Os resultados contraditórios devem-se ao fato de que o primeiro estudo não analisou *S. mutans* e *S. sobrinus* separadamente.

A diversidade fenotípica e genética de *S. mutans*, detectadas através da Mutacinotipagem e da AP-PCR, respectivamente, não foram relacionadas positivamente com a atividade de cárie. A comparação com dados obtidos por outros autores, nesta mesma linha de pesquisa, torna-se restrita, uma vez que os parâmetros na escassa literatura, como o tipo de metodologia empregada, marcadores genéticos, números de isolados, sítios analisados e idade da amostra se diferenciam.

ROSA (2001), sugeriu que indivíduos “bons controladores de placa” ou livres de cárie mantém a população de estreptococos grupo mutans controlada e abaixo das concentrações sujeitas aos fenômenos de *quorum sensing*, com expressão de mutacinas. A pressão seletiva diminuída exercida pelas mutacinas, possibilitaria a colonização de novas variantes genéticas, podendo resultar em relativa diversidade genética de *S. mutans* nos 8

voluntários livres de cárie analisados (3 a 7 genótipos, detectados através do MLEE – *Multilocus Enzyme Electrophoresis*).

A baixa atividade mutacinogênica, exercida por *S. mutans* isolados de voluntários sem cárie, contra estreptococos cariogênicos, também poderia servir como subsídio para o entendimento da diversidade genética de *S. mutans* observada nestes indivíduos (2 a 7 genótipos detectados por AP-PCR).

Já na cavidade bucal de indivíduos cárie-ativos, a seleção de *S. mutans*, no ambiente bucal altamente competitivo, poderia priorizar a colonização de cepas produtoras de mutacinas de amplo espectro inibitório. A relativa diversidade genética de *S. mutans* detectada pela AP-PCR (3 a 13 genótipos) em voluntários com cárie, poderia ser maior, se a atividade mutacinogênica de cepas prevalentes exercesse menor pressão seletiva sobre espécies grupo mutans.

Estudos sobre a biodiversidade de espécies cariogênicas podem fornecer maiores informações quando associados às análises dos fatores de virulência como: acidogênese, aciduridade, mutacinogênese e capacidade de aderência, pois a colonização de múltiplos clones da espécie, não é um bom indicador de risco de cárie, uma vez que estas cepas podem sobreviver, no ambiente, em homeostase, expressando baixa patogenicidade.

## 6. CONCLUSÃO

Sob as condições experimentais utilizadas nesse estudo, pode-se concluir que:

- *S. mutans* isolados de voluntários cárie-ativos possuem maior espectro de atividade antimicrobiana sobre a maioria das cepas indicadoras utilizadas em relação aos *S. mutans* isolados de voluntários livres de cárie;
- *S. mutans* isolados de voluntários livres de cárie demonstram atividade inibitória potencializada contra os colonizadores prevalentes nesta população, representados por algumas cepas de *S. sanguinis*, *S. mitis* e *S. oralis*;
- A Mutacinotipagem e a AP-PCR são técnicas que permitem detectar a diversidade fenotípica e genotípica de *S. mutans*, respectivamente;
- Não há correlação positiva entre diversidade fenotípica/genotípica e atividade de cárie;
- Os agrupamentos fenotípico e genotípico determinados pela Mutacinotipagem e a AP-PCR, respectivamente, têm baixo grau de associação entre eles;
- A técnica de AP-PCR tem maior capacidade discriminatória na tipagem de *S. mutans* em relação a Mutacinotipagem.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AJDIC, D. *et al.* Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 99, n.22, p. 14434-14439, Oct. 2002.
2. ALALUUSUA, S. *et al.* Mutacin activity of strains isolated from children with varying levels of mutans streptococci and caries. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.36, n.4, p.251-255, 1991.
3. ALALUUSUA, S. Transmission of mutans streptococci. **Proc Finn Dent Soc**, Helsinki, v.87, n.4, p.443-447, 1991.
4. ALALUUSUA, S. *et al.* The demonstration by ribotyping of the stability of oral *Streptococcus mutans* infection over 5 to 7 years in children. **Archs Oral Biol**, Oxford, v. 39, n.6, p. 467-471, June 1994.
5. ALALUUSUA, S. *et al.* Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.41, n.2, p.167-173, Feb 1996.
6. ALI, S.B.-S. *et al.* Diversity of *S. mutans* bacteriocins as confirmed by DNA analysis using specific molecular probes. **Gene**, Amsterdam, v.283, n.1-2, p.125-131, Jan 2002.
7. ALLGAIER, H. *et al.* Epidermin: sequencing of a heterodetic tetracyclic 21-peptide amide antibiotic. **Eur J Biochem**, Berlim, Nova York and Springe-Verlag, v.160, n.1, p.9-22, Oct 1986.
8. ALONSO, R. *et al.* Comparison of serotype, biotype and bacteriocintype with rDNA RFLP patterns for the type identification of *Serratia marcescens*. **Epidemiol Infect**, Cambridge, v.11, n.1, p. 99-107, Aug 1993.

9. ALTENA, K. *et al.* Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. **Environ Microbiol**, Oxford, v.66, n.6, p.2565-2571, Jun 2000.
10. ANDERSON, D.M.; EBERSOLEJ.L; NOVAK, M.J. Functional properties of nonhuman primate antibody to *Porphyromonas gingivalis*. **Infect Immun**, Washington, v.63, n.9, p.3245-3252, Sep 1995.
11. ANDERSSSEN, E.I. *et al.* Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and and JK, and the induction factor plantaricin. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.64, n.6, p.2269-2272, Jun 1998.
12. APELGREN, L.D. & DAJANI, A.S. Purification of a streptococcal bacteriocin (viridin B) and its separation from  $\alpha$ -hemolysin. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.15, n.3, p.436-439, Mar 1979.
13. ARBEIT, R.D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: **Manual of clinical microbiology**. Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C.; Tenover, R.H., eds. 7 th ed. ASM Press: Washington, D.C. pp.: 116-137, 1999.
14. BALAKRISHNAN, M.; SIMMONDS, R.S.; KILIAN, M. Different bacteriocin activities of *S. mutans* reflect distinct phylogenetic lineages. **J Med Microbiol**, Edinburgh and Livingstone, v.51, n.11, p.941-948, Nov 2002.
15. BERKOWITZ, R.J.; JORDAN, H.V.; WHITE, G. The early establishment of *S. mutans* in the mouths of infants. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.20, n.3, p.171-174, Mar 1975.
16. BERKOWITZ, R.J. & JORDAN, H.V. Similarity of bacteriocins of *Streptococcus mutans* from mother and infant. **Archs Oral Biol**, Oxford, v. 20, n.11, p. 725-730, Nov 1975.
17. BERKOWITZ, R.J. & JONES, P. Mouth-to-mouth transmission of the bacterium *S. mutans* between mother and child. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.30, n.4, p.377-379, 1985.

18. BONDY, M. *et al.* *S. mutans*: classification in bacteriocin-types. **Microbiologica**, Pavia, v.14, n.3, p.223-228, Jul 1991.
19. BOWDEN, G.H. Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.25, n.1, p.76-81, Feb 1997.
20. BOWDEN, G.H.W. & HAMILTON, I.R. Survival of oral bacteria. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, v.9, n.1, p.54-85, 1998.
21. BRATTHALL, D. Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *S. mutans*. **Odontol Revy**, v.21, p.143-152, 1970.
22. BRATTHALL, D. The global epidemiology of mutans streptococci. In: Johnson NW (ed) Dental caries. Risk markers of oral disease, v. I, Cambridge, Cambridge University Press: 287-312, 1991.
23. BROCK, T.D.; PEACHER, B.; PIERSON, D. Survey of the bacteriocines of enterococci. **J Bacteriol**, Washington, v.4, p.702-707, 1963.
24. BROWN, J.P.; JUNNER, C.; LIEW, V. A study of *S. mutans* levels in both infants with bottle caries and their mothers. **Aust Dent J**, Sydney, v.30, n.6, p.96-98, April 1985.
25. BUCHMAN, G.W.; BANERJE, S.; HANSEN, J.N. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. **J Biol Chem**, Baltimore, v.263, n.31, p.16260-16266, Nov 1988.
26. CARLSSON, J. *et al.* Establishment of *S. sanguis* in the mouths infants. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.15, n.12, p.1143-1148, Dec 1970.
27. CARLSSON, J. GRAHNEN, H. JONSSON, G. Lactobacilli and streptococci in the mouths of children. **Caries Res**, Basel, v.9, n.5, p.333-339, 1975.

28. CATALANOTTO, F.A.; SHKLAIR, I.L.; KEENE, H.J. Prevalence and localization of *S. mutans* in infants and children. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.91, n.3, p.606-609, Sep 1975.
29. CAUFIELD, P.W. *et al.* Distinct bacteriocin groups correlated with different groups of *S. mutans* plasmids. **Infect Immun**, Washington, v.48, n.1, p.51-56, Apr 1985.
30. CAUFIELD, P.W. *et al.* Plasmids in *S. mutans*: usefulness as epidemiological markers and association with mutacins. In: HAMADA, S.; ZMICHALEK, S.M.; KIYONO, H.; MENAKER, I.; MCGHEE, J.R. (eds) *Molecular microbiology and immunology of S. mutans*, Amsterdam, Elsevier Science Publishers, p.217-223, 1986.
31. CAUFIELD, P.W. & WALKER, T.M. Genetic diversity within *S. mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphism. **J Clin Microbiol**, Washington, v.27, n.2, p.274-278, Feb 1989.
32. CAUFIELD, P.W. *et al.* Evidence that mutacin II production is not mediated by a 5.6-kb plasmid in *S. mutans* **Plasmid**, Nova York, v.58, n.2, p.110-118, Sep 1990a.
33. CAUFIELD, P.W.; SHAH, G.R.; HOLLINGSHEAD, S.K. Use of transposon Tn916 to inactivate and isolate a mutacin-associated gene from *S. mutans*. **Infect Immun**, Washington, v.58, n.12, p.4126-4135, Dec 1990b.
34. CAUFIELD, P.W. *et al.* Infants acquire mutans streptococci from mothers during a discrete window. **J Dent Res**, Chicago, v.70 Special Issue, p.367, 1991.
35. CAUFIELD, P.W.; CUTTER, G.R.; DASANAYAKE, A.P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **J Dent Res**, Chicago, v.72, n.1, p.37-45, Jan 1993, [Abstract].
36. CAUFIELD, P.W. Dental caries – a transmissible and infectious disease revisited: a position paper. **Pediatric Dent**, Chicago, v.19, n.8, p.491-498, Nov-Dec 1997.

37. CAUFIELD, P.W. Natural history of *S. sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. **Infect Immun**, Washington, v.68, n.7, p.4018-4023, Jul. 2000.
38. CHAO, L. & LEVIN, B.R. Structured habitats and the evolution of anticompetitor toxins in bacteria. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v.78, n.10, p.6324-6828, Oct 1981.
39. CHEN, C. & SLOTS, J. Arbitrarily primed polymerase reaction analysis of periodontal pathogens. **Clin Infect Dis**, Chicago, v.20, Suppl.2, p.301-303, Jun 1995.
40. CHEN, P.; QI, F.; NOVAK, J.; CAUFIELD, P.W. The specific genes for lantibiotic Mutacin II biosynthesis in *S. mutans* T8 are clustered and can be transferred en bloc. **Appl Environ Microb**, Washington, v.65, n.3, p.1356-1360, Mar 1999.
41. COLBY, S.M; HARRINGTON, D.J.; RUSSEL, R.R.B. Identification and genetic characterization of melibiose-negative isolates of *S. mutans*. **Caries Res**, Basel, v.29, n.5, p.407-412, 1995.
42. DAVEY, A.L. & ROGERS A.H. Multiple types of the bacterium *S. mutans* in the human mouth and their intrafamily transmission. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.29, n.6, p.453-460, 1984.
43. DELISLE, A.L. Properties of mutacin b, an antibacterial substance produced by *S. mutans* strain BHT. **Microbios**, Cambridge, v.46, n.186, p.21-28, 1986.
44. DEMPSTER, R.P. & TAGG, J.R. The production of bacteriocin-like substances by the oral bacterium *S. salivarius*. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.27, n.2, p.151-157, 1982.
45. de STOPPELAAR, J.D; van HOUTE, J.; BACKER-DIRKS, O. The relationship between extracellular polysaccharide-producing streptococci and smooth surface caries in 13-years-old children. **Caries Res**, Basel, v.3, n.2, p.190-199, 1969.

46. de VOS, W.M. *et al.* Properties of nisin Z and distribution of its gene, *nisZ*, in *Lactococcus lactis*. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.59, n.1, p.213-218, Jan 1993.
47. de VOS, W.M. *et al.* Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by Gram-positive bacteria. **Mol Microbiol**, Oxford, v.17, n.13, p.427-437, Aug 1995.
48. DONOGHUE, H.D. & TYLER, J.E. Antagonism amongst streptococci isolated from the human oral cavity. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.20, p.381-387, 1975.
49. DUFOUR, A. *et al.* IS1675, a novel lactococcal insertion element, forms a transposon-like structure including the lactacin 481 lantibiotic operon. **J Bacteriol**, Washington, v.182, n.19, p.5600-5605, Oct 2000.
50. EMANUELSSON, I.M. Mutans streptococci – in families and tooth sites. Studies on the distribution, acquisition and persistence using DNA fingerprinting, **Swed Dent J**, Jonkoping, v.148, Suppl., p.1-66, 2001.
51. EMILSON, C-G. & KRASSE, B. Support for and implications of the specific plaque hypothesis. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.93, n.2, p.96-104, Apr 1985.
52. ENGELKE, G. *et al.* Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.60, n.3, p.814-825, Mar 1994.
53. ENNAHAR, S. *et al.* Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE92 isolated from cheese. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.62, n.12, p.4381-4387, Dec 1996.
54. FABIO, U. *et al.* Production of bacteriocin-like substances by human oral streptococci. **Microbiologica**, Pavia, v.10, n.4, p.363-370, Oct 1987.
55. FITZGERALD, D.B. & KEYES, P.H. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.61, n.1, p.9-19, 1960.

56. FLÓRIO F.M. *et al.* Precocidade da aquisição de estreptococos grupo mutans. **Brazilian Oral Res**, São Paulo, v.16, p.24, Set 2002, [Resumo].
57. FREMAUX, C.; AHN, C.; LAENHAMMER, T.R. Molecular analysis of the lactacin F operon. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.59, n.11, p.3906-3915, Nov 1993.
58. FUJIWARA, T. *et al.* Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2-year-old children of Japan. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.19, n.3, p.151-154, Jun 1991.
59. FUKUSHIMA, H. *et al.* Characterization and mode of action of a purified bacteriocin from the oral bacterium *S. mutans* RM-10. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.30, n.3, p.229-234, 1985.
60. GASTON, M.A. & HUNTER, P.R. Efficient selection of tests for bacteriological typing schemes. **J Clin Pathol**, London, v.24, n.7, p.291-295, Jul 1987.
61. GONÇALVES, R. B. & MOUTON, C. Identical clonal types of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella nigrescens* recovered from infected root canals and subgingival plaque. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.14, n.3, p.197-200, Jun 1999.
62. GRÖNROOS, L. *et al.* Mutacin production by *Streptococcus mutans* may be promote transmission of bacteria mother to child. **Infect Immun**, Washington, v.66, n.6, p.2595-2600, Jun 1998.
63. GRÖNROOS, L. & ALALUUSUA, S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. **Caries Res**, Basel, v.34, n.6, p.474-480, Nov-Dec. 2000.
64. GROSS, E. & MORELL, J.L. The structure of nisin. **J Am Chem Soc**, Easton, v.93, n.18, p.4634-4635, Sep 1971.
65. HAMADA, S. & OOSHIMA, T. Inhibitory spectrum of a bacteriocinlike substance (mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. **J Dent Res**, Chicago, v.54, n.1, p.140-145, Jan-Feb 1975a.

66. HAMADA, S. & OOSHIMA, T. Production and properties of bacteriocins (mutacins) from *S. mutans*. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.20, n.10, p.641-648, Oct 1975b.
67. HAMADA, S.; MASUDA, N.; KOTANI, S. Isolation and serotyping of *S. mutans* from teeth and feces of children. **J Clin Microbiol**, Washington, v.11, n.4, p.314-318, Apr 1980.
68. HAMADA, S. & SLADE, H.D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev**, Washington, v.44, n.2, p.331-384, Jun 1980.
69. HAMADA, S.; IMANISHI, H.; OOSHIMA, T. Isolation and mode of action of a cell-free bacteriocin (mutacin) from serotype g *S. mutans* MT3791. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyr Ser A**, Stuttgart and Nova York, v.261, n.13, p.287-298, May 1986.
70. HARDIE, J.M. Oral *Streptococci*. pp. 1054-1063. In: SNEATH, P.H.A; MAIR, N.S; SHARPE, M.E. & HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v.2. Williams & Wilkins, Baltimore, 1986.
71. HAVARSTEIN, L.S.; DIEP, D.B.; NES, I.F. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. **Mol Microbiol**, Oxford, v.16, n.2, p.229-240, Apr 1995.
72. HEIDRICH, C. *et al.* Isolation, characterization, and heterologous expression of the novel lantibiotic epicidin 280 and analysis of its biosynthetic gene cluster. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.64, n.9, p.3140-3146, Sep 1998.
73. HENDERSON, J.T.; CHOPKO, A.L.; DYCK van WASSENAAR, P.D. Purification and primary structure of pediocin PA-1, produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-10. **Arch Biochem Biophys**, Nova York, v.295, n.1, p.5-12, May 1992.
74. HILLMAN, J.D.; JOHNSON, K.P.; YAPHE, B.I. Isolation of a *S. mutans* strain producing a novel bacteriocin. **Infect Immun**, Washington, v.44, n.1, p.141-144, Apr 1984.

75. HILLMAN, J.D.; YAPHE, B.I.; JOHNSON, K.P. Colonization of the human oral cavity by a strain of *S. mutans*. **J Dent Res**, Chicago, v.64, n.11, p.1272-1274, Nov 1985.
76. HILLMAN, J.D.; DZUBACK, A.L.; ANDREWS, S.W. Colonization of the human oral cavity by a *S. mutans* mutant producing increased bacteriocin. **J Dent Res**, Chicago, v.66, n.6, p.1092-1094, Jun 1987.
77. HILLMAN, J.D. *et al.* Construction and characterization of an effector strain of *S. mutans* for replacement therapy of dental caries. **Infect Immun**, Washington, v.68, n.2, p.543-549, Feb. 2000.
78. HYNES, W.L.; FERRETTI, J.P.; TAGG, J.R. Cloning of the gene encoding streptococcin A-FF22, a novel lantibiotic produced by *S. pyogenes*, and determination of its nucleotide sequence. **Appl Envir Microb**, Washington, v.59, n.6, p.1969-1971, Jun 1993.
79. IKEDA, T. *et al.* Purification and certain properties of a bacteriocin from *S. mutans*. **Infect Immun**, Washington, v.35, n.3, p.861-868, Mar.1982.
80. IKEDA, T.; KURITA, T.; HIRASAWA, M. Suppression of *S.sobrinus* 6715 (g) in plaques by *S. mutans* 32K (c). **J Oral Pathol**, Copenhagen, v.17, n.9-10, p.471-474, Nov 1988.
81. ITO, T. Group H streptococcal bacteriocins having no relation to bacterial transformation. **Microbiol Immunol**, Tokyo, v.26, n.2, p.93-105, 1982.
82. JACK, R. *et al.* The genetics of lantibiotic biosynthesis. **BioEssays**, Nova York, v.17, n.9. p.793-802, Sep 1995.
83. JACOB, F.; LWOFF, A.; SIMINOVITCH, A. & WOLLMAN, E. Definition de quelques termes relatifs a la lysogénie. **Ann. Inst. Pasteur**, Paris, v.84, p.222-224, 1953.
84. JUNG, G. Lantibiotics: a survey, p. 1-34. *In* G. Jung and H.G. Sahl (es.), Nisin and novel lantibiotics. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1991.

85. KALETTA, C. *et al.* Pep 5, a new lantibiotic: structural gene isolation and prepeptide sequence. **Arch Microbiol**, Berlin, Nova York and Springer-Verlag, v.152, n.1, p.16-19, 1989.
86. KELSTRUP, J. & GIBBONS, R.J. Bacteriocins from human and rodent streptococci. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.3, n.3, p.251-258, Mar 1969 a.
87. KELSTRUP, J. & GIBBONS, R.J. Inactivation of bacteriocins in the intestinal canal and oral cavity. **J Bacteriol**, Washington, v.12, n.3, p.888-889, Sep 1969b.
88. KELSTRUP, J.; RICHMOND, C.W. & GIBBONS, R. J. Fingerprinting human oral Streptococci by bacteriocin production and sensitivity. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.15, n.12, p.1109-1116, Dec 1970.
89. KELSTRUP, J. & FUNDER-NIELSEN, T.D. Synthesis of bacteriocins in liquid cultures of *S. mutans*. **J Biol Buccale**, Paris, v.5, n.2, p.99-106, Jun 1977.
90. KEMP, C.W. *et al.* Application of a competition model to the growth of *S. mutans* and *S. sanguinis* in binary continuous culture. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.45, n.4, p.1277-1282, Apr 1983.
91. KEYES, P.H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.1, p.304-20, 1960.
92. KLEIN, M.I. *et al.* Transmissão, diversidade e estabilidade clonal de *S. mutans*: estudo longitudinal em crianças. **Brazilian Oral Res**, São Paulo, v.16, p.187, Sep 2002, [Resumo].
93. KÖHLER, B. & BRATTHALL, D. Intrafamilial levels of *S. mutans* and some aspects of the bacterial transmission. **Scan J Dent Res**, Copenhagen, v.86, p.35-42, 1978.
94. KÖHLER, B. & KRASSE, B. Human strains of mutans streptococci show different cariogenic potential in the hamster model. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.5, n.4, p.177-180, Aug 1990.
95. KOZAI, K. *et al.* Changes in strains of mutans straptococci induced by treatment with chloreixidine barniz, **J Dent Res**, Chicago, v.70, n.9, p.1252-1257, Sep 1991.

96. KREULEN, C.M.; DE SOET, H.J.; HOGEVEEN, R. & VEERKAMP, J.S. *Streptococcus mutans* in children using nursing bottles. **ASDC J Dent Child**, Fulton, v.64, n.2, p.107-111, Mar-Apr 1997.
97. KUIPERS, O.P. *et al.* Characterization of the nisin gene cluster nisABTCIPR of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the nisA and nisI genes for development of immunity. **Eur J Biochem**, Berlin, Nova York and Springer-Verlag, v.216, n.9, p.281-291, Aug 1993.
98. KULKARNI, G.V.; CHAN, K.H.; SANDHAM, H.J. An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of mutans streptococci. **J Dent Res**, Chicago, v.68, n.7, p.1155-1161, Jul 1989.
99. LAWRENCE, J.G. Selfish operons and speciation by gene transfer. **Trends Microbiol**, Cambridge, v.5, n.9, p.355-359, Sep 1997.
100. LI, Y. & CAUFIELD, P.W. Arbitrary primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.13, p.17-22, Feb. 1998.
101. LOESCHE, W.J. *et al.* Association of *S. mutans* with human dental decay. **Infect Immun**, Washington, v.11, n.6, p.1252-1260, Jun 1975.
102. LOESCHE, W.J. & BHAT, M. Evaluation of diagnostic broths for *S. mutans*, p.291-301. *In*: Stiles, H.M.; Loesche, W.J.; O'Brien (ed.), *Microbial aspects of dental caries*. Informational Retrieval Inc., Washington, D.C., 1976.
103. LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in dental decay. **Microbiol Rev**, Washington, v.50, n.4, p.353-380, Dec 1986.
104. MARCISSET, O. *et al.* Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. **J Biol Chem**, Baltimore, v.272, n.22, p.14277-14284, May 1997.

105. MARCOTTE, H. & LAVOIE, M.C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulina A. **Microbiol Mol Biol Reviews**, Washington, v.62, n.1, p.71-109, Mar 1998.
106. MARSH, P.D. & MARTIN, M.V. Oral microbiology, *In Aspects of microbiology 1*. 2<sup>nd</sup> ed. Edited by J.A.Cole, C.J.Knowles, and D. Schlessinger. American Society for Microbiology, Washington, 1984.
107. MARSH, P.D. Host defenses and microbial homeostasis: role of microbial interactions. **J Dent Res**, Washington, v.68, p.1567-1575, 1989.
108. MATTOS-GRANER, R.O. *et al.* Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5 – year-old Brazilian children. **Caries Res**, Basel, v.32, n.5, p.319-323, Sep-Oct 1998.
109. MATTOS-GRANER, R.O. *et al.* Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggest horizontal transmission. **J Clin Microbiol**, Washington, v.39, n.6, p.2313-2316, Jun 2001a.
110. MATTOS-GRANER, R.O. *et al.* Cloning of the *S. mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. **Infect Immun**, Washington, v.69, n.11, p.6931-6941, Nov 2001b.
111. McKEE, A. S.; McDERMIDE, D. C.; ELWOOD, D.C.; MARCH, P.D. The establishment of reproducible, complex communities of oral bacteria in the chemostat using defined inocula. **J Appl Bacteriol**, Oxford, v.59, n.3, p.263-275, Sep 1985.
112. McLAUGHLIN, R.E.; FERRETTI, J.R.; HYNES, W.L. Nucleotide sequence of the streptococcal A-FF22 lantibiotic regulon: model for production of the lantibiotic SA-FF22 by strain of *Streptococcus pyogenes*. **FEMS Microb Lett**, Amsterdam, v.175, n.2, p.171-177, Jun 1999.
113. MENARD, C.; BROUSSEAU, R.; MOUTON, C. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primer (AP-PCR) to strain identification of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. **FEMS Microbiol Lett**, Amsterdam, v.95, n.2-3, p.163-168, Aug 1992.

114. MOLL, G. *et al.* Mechanistic properties of the two-component bacteriocin lactococcin G. **J Bacteriol**, Washington, v.180, n.1, p.96-99, Jun 1998.
115. MORENCY, H.; TRAHAN, L.; LAVOIE, M.C. Preliminary grouping of mutacins. **Can J Microb**, Ottawa, v.41, p.826-831, May 1995.
116. MORENCY, H. *et al.* Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or lantibiotic. **Can J Microb**, Ottawa, v.47, n.4, p.322-331, Apr 2001.
117. NES, I.F. & TAGG, J.R. Novel lantibiotics and pair pre-peptides. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v.69, n.2, p.89-97, Feb 1996.
118. NISSEN-MEYER, J. & NES, I.F. Ribossomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biosynthesis, and mechanism of action. **Arch Microbiol**, Berlim, Nova York and Springer-Verlag, v.167, n.2-3, p.67-77, Mar 1997.
119. NOVÁK, J.; CAUFIELD, P.W.; MILLER, E.J. Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from *S. mutans*. **J Bacteriol**, Washington, v.176, n.14, p.4316-4320, Jul 1994.
120. NYVAD, B. & KILIAN, M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and caries-inactive individuals. **Caries Res**, Basel, v.24, n.4, p.267-272, 1990.
121. OHO, T. *et al.* Simple and rapid detection of *S. mutans* and *S. sobrinus* in human saliva by Polimerase Chain Reaction. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.15, n.4, p.258-262, Aug 2000.
122. PAG, U. *et al.* Molecular analysis of expression of the lantibiotic pep5 immunity phenotype. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.65, n.2, p.591-598, Feb 1999.
123. PARROT, M.; CHAREST, M.; LAVOIE, M.C. Production of mutacin-like substances by *S. mutans*. **Can J Microbiol**, Ottawa, v.35, n.7, p.366-372, Jul 1989.

124. PAUL, D. & SLADE, H.D. Production and properties of an extracellular bacteriocin from *S. mutans* bacteriocidal for group A and other streptococci. **Infect Immun**, Washington, v.12, n.6, p.1375-1385, Dec 1975.
125. PESCHEL, A. & GÖTZ, F. Analysis of the *Staphylococcus epidermidis* genes epiF, -E, and -G involved in epidermin immunity. **J Bacteriol**, Washington, v.178, n.2, p.531-536, Jan 1996.
126. PRIDMORE, D. *et al.* Variacin, a new lanthionine-containing bacteriocin produced by *Micrococcus varians*: comparison to lacticin 481 *Lactococcus lactis*. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.62, n.5, p.1799-1802, May 1996.
127. QI, F.; CHEN, P.; CAUFIELD, P.W. Functional analyses of the promoters in the Lantibiotic Mutacin II biosynthetic locus in *Streptococcus mutans*. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.65, n.2, p.652-658, Feb 1999.
128. QI, F.; CHEN, P.; CAUFIELD, P.W. Purification and biochemical characterization of mutacin I from the group I strain of *S. mutans*, CH3, and genetic analysis of mutacin I biosynthesis genes. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.66, n.18, p.3221-3229, Aug 2000.
129. QI, F.; CHEN, P.; CAUFIELD, P.W. The group I strain of *S. mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.67, n.1, p.15-21, Jan 2001.
130. RILEY, M.A. & WERTZ, J.E. Bacteriocins: Evolution, ecology and applications. **Annu Rev Microbiol**, Palo Alto, v.56, n.5-6, p.117-137, May-Jun 2002.
131. ROGERS, A.H. Effect of the medium on bacteriocin production among strains of *S. mutans*. **Appl Microbiol**, Washington, v.24, n.2, p. 294-295, Aug. 1972.
132. ROGERS, A.H. Bacteriocin production and susceptibility among strains of *S. mutans* grown in the presence of sucrose. **Antimicrob Ag Chemo**, Washington, v.6, p.547-550, 1974

133. ROGERS, A.H. Bacteriocin types of *S.mutans* in human mouths. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.20, n.12, p.852-858, Dec 1975.
134. ROGERS, A.H. Bacteriocinogeny and the properties of some bacteriocins of *S. mutans*. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.21, n.2, p.99-104, 1976.
135. ROGERS, A.H.; van der HOEVEN, J.S.; MIKX, F.H.M. Effect bacteriocin production by *S. mutans* on the plaque gnotobiotic rats. **Infect Immun**, Washington, v.23, p.571-576, 1979.
136. ROGERS, A.H. The source of infection in the intrafamilial transfer of *S. mutans*. **Caries Res**, Basel, v.15, n.1, p.26-31, 1981.
137. ROSS, K.F.; RONSON, C.W.; TAGG, J.R. Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene *sal A* from *Streptococcus salivarius* 20P3. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.59, n.7, p.2014-2021, Jul 1993.
138. RUSSELL, R.R.B. *et al.* A binding protein-dependent transport system in *S. mutans* responsible for multiple sugar metabolism. **J Biol Chem**, Baltimore, v.267, n.7, p.4631-4637, Mar 1992.
139. SAARELA, M. *et al.* Genetic diversity within isolates of mutans streptococci recognized by an rRNA gene probe. **J Clin Microbiol**, Washington, v.31, n.3, p.584-587, Mar1993.
140. SAARELA, M. *et al.* Typing of mutans streptococci by arbitrary primed polymerase chain reaction. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.41, n.8-9, p.821-826, Aug-Sep 1996.
141. SAHL, H.-G.; JACK, R.W.; BIERBAUM, G. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. **Eur J Biochem**, Berlim, Nova York and Springer-Verlag, v.230, n.3, p.827-853, Jun 1995.
142. SAHL, H.-G. & BIERBAUM, G. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. **Annu Rev Microbiol**, Palo Alto, v.52, p. 41-79, 1998.

143. SANDERS, C.C. & SANDERS, W.E. Enocin: an antibiotic produced by *Streptococcus salivarius* that may contribute to protection against infections due to group A streptococci. **J Infect Dis**, Chicago, v.146, n.5, p.683-690, Nov 1982.
144. SARIS, P.E.J. *et al.* Immunity to lantibiotics. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v.69, n.2, p.151-159, Feb 1996.
145. SCHELL, N. *et al.* Prepeptide sequence of epidermin, a ribossomally synthesized polypeptide antibiotic containing four sulphide-rings. **Nature**, London, v.333, n.19, p.276-278, May 1988.
146. SCHLEGEL, R. & SLADE, H.D. Bacteriocin production by transformable group H streptococci. **J Bacteriol**, Washington, v.112, n.2, p.824-829, Nov 1972.
147. SHIROZA, T. *et al.* Rapid isolation of chromosomal DNA from oral streptococci and polymerase chain-reaction oriented restriction fragment-length polymorphism analysis for genetic heterogeneity. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.13, n.1, p.11-16, Feb 1998.
148. SIEZEN, R.J.; KUIPERS, O.P.; de VOS, W.M. Comparison of lantibiotic gene clusters and encoded proteins. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v.69, n.2, p.171-184, Feb 1996.
149. SKAUGEN, M.; ABILDGAARD, C.I.; NES, I.F. Organization and expression of a gene cluster involved in the biosynthesis of the lantibiotic lactocin S. **Mol Gen Genet**, Berlin, Nova York and Springer-Verlag, v.253, n.6, p. 674-686, Feb 1997.
150. SOCRANSKY, S.S. *et al.* Associations between microbial species in subgingival plaque samples. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.3, n.17, p.1-7, Aug 1988.
151. SOLOMON, J.M. & GROSSMAN, A.D. Who's competent and when: Regulation of natural genetic competence in bacteria. **Trends Genet**, Amsterdam, v.12, n.4, p.150-154, Apr 1996.
152. SPOLIDÓRIO, D.M.P. *et al.* Identificação genética intrafamiliar de *S. mutans* por AP-PCR. **Brazilian Oral Res**, São Paulo, v.15, p.144, Sep 2001.

153. STEIN, T. *et al.* Function of *Lactococcus lactis* immunity genes *nisl* and *nisFEG* after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis*. **J Biol Chem**, Baltimore, v.278, n.1, 89-94, Jan 2003.
154. TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocin of a group B streptococcus: partial purification and characterization. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.7, n.3, p.764-772, Sep 1976.
155. TAGG, J.R. & BANNISTER, L.V. Fingerprinting  $\beta$ -haemolytic streptococci by their production of and sensibility to bacteriocine-like inhibitors. **J Med Microbiol**, Edinburgh and Livingstone, v.12, p.397-411, 1979.
156. THEILADE, E. Factors controlling the microflora of the healthy mouth, p. 2-56. *In* M. J. HILL and P. D. MARSH (ed.), **Human microbial ecology**. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1990.
157. USHIRO, I. *et al.* Chromosomal deletions in melibiose-negative isolated of *S. mutans*. **J Dent Res**, Chicago, v.70, n.11, p.1422-1426, Nov 1991.
158. van der HOEVEN, J.S. & ROGERS, A.H. Stability of the resident microflora and bacteriocinogeny of *S. mutans* as factors affecting its establishment in pathogen-free rats. **Infect Immun**, Washington, v.23, n.2, p.206-212, Feb. 1979.
159. van der HOEVEN, J. S.; JONG, M.H.; CAMP, P.J.M.; van den KIEBOON. Competition between oral *Streptococcus* species in the chemostat under alternating conditions of glucose limitation and excess. **FEMS Microbiol Ecol**, Amsterdam, v.31, p.373-379, 1985.
160. van HOUTE, J. *et al.* Mutans streptococci and non-mutans streptococci acidogenic at low pH, and *in vitro* acidogenic potential of dental plaque in two different areas of the human dentition. **J Dent Res**, Chicago, v.70, n.12, p.1503-1507, Dec, 1991.
161. van LOREVEN, C.; BUIJS, J.F.; ten CATE, J.M. Similarity of bacteriocin activity profiles of mutans streptococci within the family when the children strains after the age of 5. **Caries Res**, Basel, v.34, n.6, p.481-485, Nov-Dec 2000.

162. VINCENT, G.H. *et al.* Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.64, n.9, p. 3275-3281, Sep 1998.
163. WALTER, R.G. & SHKLAIR I.L. *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active naval recruits. **J Dent Res**, Chicago, v.61, n.11, p.1229-1232, Nov 1982.
164. WANG, G. *et al.* RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. **Nucleic Acids Res**, London, v.21, n.25, p.5930-5933, Nov. 1993.
165. WEERKAMP, A.; VOGELS, G.D.; SKOTNICKI, M. Antagonistic substances produced by streptococci from human dental plaque and their significance in plaque ecology. **Caries Res**, Basel, v.11, n.5, p.245-256, 1977.
166. WEIL, H.P. *et al.* Biosynthesis of the lantibiotic pep 5. **Eur J Biochem**, Berlin, Nova York and SPRINGER-Verlag, v.194, n.1, p.217-223, Nov 1990.
167. WELSH, J.O.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res**, London, v.18, n.24, p.7213-7218, Dec. 1990.
168. WILLIAMS, J.G.K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Res**, London, v.18, n.22, p.6531-6535, Nov. 1990.
169. WOODRUFF, W.A.; NOVÁK, J.; CAUFIELD, P.W. Sequence analysis of *mutA* and *mutM* genes involved in the biosynthesis of the lantibiotic mutacin II in *S. mutans*. **Gene**, Amsterdam, v.206, n.1, p.37-43, Jun 1998.

## OBRAS CONSULTADAS

1. AZEVEDO, R.V.P. **O emprego da bacteriocinotipagem (mutacinotipagem) no rastreamento epidemiológico de estreptococos do grupo mutans.** Tese de doutorado, São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1988, 110 p.
2. CAZORLA, I.M. **Apostila de Estatística.** Capítulo 7: Análise de Dados Categóricos, p. 146-155.
3. DAMETTO, V.F. ***Streptococcus salivarius*: Detecção de cepas produtoras de substâncias semelhantes a bacteriocina contra algumas bactérias bucais.** Tese de doutorado, São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo 1987, 79p.
4. NASCIMENTO, M.M. **Polimorfismo genético de *Streptococcus mutans* isolados da cavidade oral de indivíduos com lesões de cárie coronária e radicular.** Tese de mestrado, Piracicaba: FOP-Unicamp, 2002, 96p.
5. ROSA, R.T. **Detecção de polimorfismo genético de *Streptococcus mutans* isolados de indivíduos livres de cárie.** Tese de mestrado, Piracicaba: FOP-Unicamp, 2001, 85p.

*De acordo com a NBR-6023, de agosto de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).*

# ANEXOS

## 1. MEIOS DE CULTURA

### **ANEXO 1.1 – Meio Mitis Salivarius Bacitracina (MSB)**

Mitis Salivarius Ágar	90g
Sacarose	150g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Aquecer o meio até ferver para dissolução completa. Esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C. Resfriar até 50-55°C. Adicionar a solução de Bacitracina (0,2 U/mL) esterilizada por filtração (membranas filtrantes Milipore com poro de 0,22µm). Dispensar em placas de Petri previamente esterilizadas.

### **ANEXO 1.2 – Caldo de Infusão de Cérebro e Coração**

BHI	37g
Extrato de Levedura	5g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

### **ANEXO 1.3 – Caldo de Infusão de Cérebro e Coração Glicerol a 10% (BHI-Glicerol 10%)**

BHI	37g
Extrato de Levedura	5g
Glicerol	100mL
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

### **ANEXO 1.4 – Ágar de Soja Tríplico a 1,5% (TSA a 1,5%)**

TSA	40g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

#### **ANEXO 1.5 – Caldo de Soja Triptico (TSB)**

TSB	30g
Extrato de Levedura	5g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

#### **ANEXO 1.6 – Ágar de Soja Triptico a 0,8% (TSA a 0,8%)**

TSB	30g
Ágar	8g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

## **2. SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA AP-PCR E ELETROFORESE**

### **2.1 – Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 5X**

Tris HCl	54g
Ácido Bórico	27,5g
EDTA (0,5M / pH 8,0)	20mL
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Misturar 20 mL de EDTA com 500mL de água destilada e dissolver os outros reagentes. Adicionar a água até completar o volume de 1 litro. Acertar o pH final para 8,0 adicionando HCl.

**Solução Trabalho – TBE 1X** – Utilizada para preparar o gel de agarose e preencher a cuba eletroforética.

Diluir o tampão TBE 5X –  $C_f \times V_f = C_i \times V_i$ .

### **2.2 – Corante Azul (Lowading buffer ou Tampão de corrida)**

Bromofenol <i>Blue</i>	0,125g
Xilene Cyanol	0,125g
Glicerol	15mL
Água destilada	

Adicionar 20 mL de água destilada aos 15 mL de glicerol e misturar os solutos. Completar com água até atingir o volume final de 50 mL.

**2.3 – Solução TE (Tris-EDTA) 0,01M/pH 8,0** – Utilizada para diluição de *primers* e DNA (extração).

Tris HCl (1M / pH 8,0)	5mL
EDTA (0,5M / pH 8,0)	1mL
Água destilada	

Misturar os reagentes e completar com água destilada até atingir o volume final de 500mL. Acertar o pH final para 8,0 adicionando NaOH concentrado.

**2.4 – Brometo de Etídio (10 mg/mL)** – Utilizado para corar o gel de agarose.

Brometo de Etídio 10 mg/mL	200µL
Água destilada	400mL

Misturar os reagentes. Concentração final da solução: 0,5 µg/mL.

### **3. ANEXO ESTATÍSTICA**

#### **Análise do Grau de Associação: Mutacinotipagem x AP-PCR**

##### **3.1. Análise de dados categóricos**

Neste tópico em anexo, estudaremos a relação entre duas variáveis categóricas ou qualitativas (o agrupamento fenotípico e genotípico de *S. mutans*), onde as observações podem ser classificadas em uma das várias categorias (níveis ou células), mutuamente exclusivas.

##### **3.2. Tabelas de contingência**

Segundo o dicionário Webster o termo “contingency” significa a qualidade ou estado de se ter uma conexão ou relação aproximada. O termo “contingency table” se

refere ao fato de que as tabelas construídas são usadas para testar a existência de relações entre duas variáveis. Observamos que, infelizmente, este termo em português não tem o mesmo significado. Segundo o Aurélio, “contingência” significa qualidade do que é contingente, incerteza se uma coisa vai acontecer ou não e “contingente” significa que pode ou não suceder, eventual, incerto. Logo, em estatística, quando nos referimos a palavra “contingência” estamos tomando o mesmo significado da língua inglesa.

### 3.3. Likelihood Ratio $\chi^2$

O teste chi-quadrado ( $\chi^2$ ) pode ser usado para avaliar a relação entre duas variáveis qualitativas. Este teste é um teste não paramétrico, que é muito útil, pois não precisa da suposição de normalidade das variáveis para analisar o grau de associação entre as duas variáveis, porém este teste é menos poderoso que o teste paramétrico.

Infelizmente, o teste chi-quadrado não permite concluir como se dá a relação, uma vez que ele testa apenas a hipótese geral de que as duas variáveis são independentes. Uma outra limitação do teste chi-quadrado é que o valor esperado das células não deve ser menor ou igual a 5, pois isso torna vulnerável a estatística. Nesse caso, para a análise dos dados, utilizou-se uma variante do teste chi-quadrado, o likelihood ratio qui-quadrado.

Partindo-se do princípio de que:

Hipótese nula (Ho): independência de variáveis

Hipótese alternativa: dependência de variáveis

Pergunta-se: Como deveriam ser os valores a serem observados se as variáveis fossem independentes? Ou sob a hipótese de nulidade, de independência de variáveis, como deveriam ser os valores a serem observados? A lógica nos diz que esses valores devem estar muito próximos da estrutura percentual global. Esses valores são chamados de valores esperados.

Calculando os valores esperados, sobre a suposição de independência, temos:

$$esperado = \frac{total\_linha * total\_coluna}{total\_geral} = total\_linha * \frac{total\_coluna}{total\_geral} = total\_coluna * \frac{total\_linha}{total\_geral}$$

Dentro de cada célula, observa-se na 1ª linha o valor observado, na 2ª linha o valor esperado (sob a hipótese de independência) e, na 4ª linha, a distância entre o observado e o esperado. Logo, se as variáveis fossem independentes, as distâncias entre os valores observados e esperados deveriam ser muito pequenas, caso contrário haverá indícios de dependência. A pergunta agora é: quando a distância é pequena ou grande? Para isto devemos calcular o valor chi-quadrado da amostra:

$$\chi^2_{amostra} = \sum \frac{(\text{observado} - \text{esperado})^2}{\text{esperado}}$$

que terá uma distribuição chi-quadrado com graus de liberdade igual ao produto do número de linhas menos um vezes o número de colunas menos um.

$\chi^2_{amostra} \cong \chi^2_v$	⇒	$v = \text{graus de liberdade}$ $v = (\text{n}^\circ \text{colunas} - 1) \cdot (\text{n}^\circ \text{linha} - 1)$
-----------------------------------	---	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

O pacote estatístico SAS, calcula o p-valor, nesse caso é só comparar esse valor com o nível de significância desejado. No nosso caso o p-valor = 0,006, ou seja, rejeitamos ao nível de 5%, 1% e 0,6%.

Tabela de Contingência entre a Mutacinotipagem e AP-PCR

Padrão Mutacinogênico	Frequency	Cluster do AP-PCR							Total
	Percent								
	Row Pct								
	Col Pct	cluster1	cluster2	cluster3	cluster4	cluster5	cluster6	cluster7	
[00000]	3	0	0	0	3	0	0	6	
	10.34	0.00	0.00	0.00	10.34	0.00	0.00	20.69	
	50.00	0.00	0.00	0.00	50.00	0.00	0.00		
	75.00	0.00	0.00	0.00	50.00	0.00	0.00		
[00456]	0	5	0	0	0	0	0	5	
	0.00	17.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	17.24	
	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
	0.00	71.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
[04442]	0	0	0	0	0	2	0	2	
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.90	0.00	6.90	
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00		
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	28.57	0.00		
[04476]	0	2	3	0	1	5	1	12	
	0.00	6.90	10.34	0.00	3.45	17.24	3.45	41.38	
	0.00	16.67	25.00	0.00	8.33	41.67	8.33		
	0.00	28.57	100.00	0.00	16.67	71.43	100.00		
[06776]	1	0	0	1	1	0	0	3	
	3.45	0.00	0.00	3.45	3.45	0.00	0.00	10.34	
	33.33	0.00	0.00	33.33	33.33	0.00	0.00		
	25.00	0.00	0.00	100.00	16.67	0.00	0.00		
[17776]	0	0	0	0	1	0	0	1	
	0.00	0.00	0.00	0.00	3.45	0.00	0.00	3.45	
	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00		
	0.00	0.00	0.00	0.00	16.67	0.00	0.00		
Total	4	7	3	1	6	7	1	29	
	13.79	24.14	10.34	3.45	20.69	24.14	3.45	100.00	

Statistics for Table of Contingency

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	30	56.7341	0.0022
Likelihood Ratio Chi-Square	30	52.5460	0.0066
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	3.4818	0.0620
Phi Coefficient		1.3987	
Contingency Coefficient		0.8135	
Cramer's V		0.6255	

Há fortes indícios de associação verdadeira entre os métodos de agrupamento

A magnitude de associação é de 81,35%

WARNING: 100% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

Sample Size = 29

#### 1.4. Coefficiente de Contingência

O coeficiente de contingência é uma medida do alcance da associação ou relação entre dois conjuntos de atributos. Ele é calculado em função do valor obtido na tabela de contingência e independe de ordenação das categorias das variáveis:

$$C = \sqrt{\frac{\chi^2}{\chi^2 + N}}$$

Onde N é o tamanho da amostra geral  
 $N = 29$   
 $\chi^2 = 56,7341$

No exemplo da tabela 1, o coeficiente de contingência será:

$$C = \sqrt{\frac{56,7341}{56,7341 + 29}} = 0,813$$

Para testar a significância deste coeficiente teríamos que recorrer a tabela própria. Felizmente, o SAS calcula o valor p, que nos permite testar a hipótese de nulidade ( $H_0$ ).

Como o valor de  $p < 0,05$ , rejeita-se a  $H_0$  e conclui-se que existe associação entre as variáveis. Convém enfatizar, que em apenas 2 dos 16 casos testados, os agrupamentos fenotípico/genotípico se associaram, verdadeiramente.

#### 4. RESULTADOS ADICIONAIS

Figura 4.1 : Total de cepas de *S. mutans* analisadas, perfis genotípicos e fenotípicos, e coeficiente de contingência entre as duas técnicas empregadas – grupo cárie.

	Voluntários								Total
	C1	C2	C3	C4	C5	C7	C8	C9	
Total de Cepas	27	19	19	16	11	16	16	17	141
Fenótipos	6	6	7	4	5	6	6	9	49
Clones AP-PCR	4	13	9	8	5	10	4	8	61
Coef. Contingência	81,35	78,45	72,60	85,95	83,37	55,91	84,14	35,76	-
Likelihood $\chi^2$ (p)	0,73	0,90	0,66	0,31	0,15	0,47	0,20	0,90	-

Figura 4.2 : Total de cepas de *S. mutans* analisadas, perfis genotípicos e fenotípicos, e coeficiente de contingência entre as duas técnicas empregadas – grupo sem cárie.

	Voluntários								Total
	A	C	D	E	G	I	O	R	
Total de Cepas	29	11	27	22	21	27	25	16	178
Fenótipos	6	5	7	4	8	4	7	3	44
Clones AP-PCR	7	5	4	5	6	4	7	2	40
Coef. Contingência	64,16	89,36	89,07	85,15	82,72	88,92	72,63	88,56	-
Likelihood $\chi^2$ (p)	0,006	0,43	0,73	0,01	0,19	0,23	0,06	0,28	-



COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
CERTIFICADO



Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Atividade e diversidade mutacínogénica de *Streptococcus mutans* isolados de voluntários cárie - ativos e livre de cáries", sob o protocolo nº 137/2001, da Pesquisadora **Regianne Umeko Kamiya**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. **Reginaldo Bruno Gonçalves**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - FOP.

Piracicaba, 29 de novembro de 2001

We certify that the research project with title "MUTACINOGENY ACTIVITY AND DIVERSITY OF *Streptococcus mutans* ISOLATED FROM CARIES - ACTIVE AND CARIES - FREE INDIVIDUALS", protocol nº 137/2001, by Researcher **Regianne Umeko Kamiya**, responsibility by Prof. Dr. **Reginaldo Bruno Gonçalves**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, November 29 2001

  
Prof. Dr. Pedro Luis Rosalen  
Secretário  
CEP/FOP/UNICAMP

  
Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes  
Coordenador  
CEP/FOP/UNICAMP