

MARCELLE MATOS NASCIMENTO

Cirurgiã Dentista

**“Polimorfismo genético de *Streptococcus mutans* isolados da
cavidade oral de indivíduos com lesões de cárie coronária e
radicular”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Cariologia.

Piracicaba

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

MARCELLE MATOS NASCIMENTO

Cirurgiã Dentista

**“Polimorfismo genético de *Streptococcus mutans* isolados da
cavidade oral de indivíduos com lesões de cárie coronária e
radicular”**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CPG-036/83
CPG, 20/07/02
Assinatura do Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Cariologia.

Orientador:	Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves
Banca Examinadora:	Prof. Dr. José Francisco Höfling
	Prof. Dr. Milton de Uzeda
	Profª. Dra. Denise M. P. Spolidório

Piracicaba

2002

UNIDADE Be
Nº CHAMADA T/UNICAMP
N17p
V EX
TOMBO BC/ 49634
PROC 16-837102
C DX
PREÇO R\$ 11,00
DATA 14/06/02
Nº CPD

CM00169269-9

BIB ID 245761

Ficha Catalográfica

N17p Nascimento, Marcelle Matos.
Polimorfismo genético de *Streptococcus mutans* isolados da cavidade oral de indivíduos com lesões de cárie coronária e radicular / Marcelle Matos Nascimento. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002.
xviii, 96p. : il.

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

1. Cáries dentárias. 2. Odontologia. I. Gonçalves, Reginaldo Bruno. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da 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 15 de Março de 2002, considerou a candidata MARCELLE MATOS NASCIMENTO aprovada.

1. Prof. Dr. REGINALDO BRUNO GONCALVES

2. Prof. Dr. MILTON UZEDA

3. Prof. Dr. JOSE FRANCISCO HOFLING

2002226547

Dedicatória

À Deus,

Pela presença constante, pela força, pela luz.

Obrigado Meu Deus!

Aos meus pais, Wanda e Gilberto,

Por mais um sonho nosso realizado, por terem compreendido minhas opções e por muitas vezes minha ausência. Deram-me o incentivo maior de todos,

o imenso amor a mim dedicado.

Muito obrigado mãe!

Muito obrigado pai!

Com amor,

Dedico.

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves**, agradeço pela incondicional orientação e contribuição à minha formação acadêmica, pelas oportunidades oferecidas e ainda por sua amizade, minha eterna gratidão.

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Magnífico Reitor, **Prof. Dr. Hermano Ferreira de Medeiros Tavares**. À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu diretor, **Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum**.

À **Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury**, coordenadora dos cursos de Pós-Graduação, e ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, **Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen**, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

Às instituições de fomento **FAPESP** e **CNPq**, pelo apoio financeiro instituído pela concessão de bolsas não apenas na pós-graduação, como na graduação.

Aos Professores da Área de Microbiologia e Imunologia, **José Francisco Höfling** e **Celso Paulino da Costa**, pelo respeito e contribuição à minha formação.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line**, por todo o estímulo e participação desde o início da minha formação científica e acadêmica.

Ao meu irmão **Leonardo**, pela amizade e compreensão. A você, meu irmão, e a toda a nossa família eu dedico os frutos desse meu trabalho.

Aos meus amigos, **André** e **Iriana**, pela amizade sincera e cumplicidade. A nossa convivência me proporcionou momentos de muita alegria e me fez perceber como é bom tê-los por perto.

Aos amigos e companheiros de turma **Andréa**, **Adriana**, **André**, **Fábio Mialhe**, **Fábio Koslóvsk**, **Iriana**, **Lydiane**, **Luciane**, **Márcia**, **Roberta**, **Rosane**, **Vanessa** e **Viviane**, e aos amigos de Pós-Graduação, **Simone**, **Alê**, **Danny**, **Léo**, **Marcelo** e **Franco**, por estarem comigo nos momentos difíceis e nos momentos agradáveis, desejo muito sucesso pessoal e profissional no caminho de todos vocês.

Aos meus colegas de Laboratório, **Marcelo Napimoga**, **Marlise**, **Meire**, **Edvaldo**, **Ana Cláudia**, **Rita**, **Regiane**, **Wagner**, **Marcelo Boriollo**, **Magda**, **Janaína**, **Rafael**, **Thaís**, **Carol** e **Fernando**.

Aos funcionários do departamento de Microbiologia e Imunologia, **Anderson** e **Wilma**, pela colaboração e disposição durante nossa convivência.

Às secretárias **Elisa**, **Érika** e **Sônia**, pela atenção em todas as fases administrativas.

Ao técnico de Laboratório de Genética da ESALQ-USP, **Beto**, pelos preciosos ensinamentos.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, compartilhando comigo a amizade, as experiências, alegrias e dificuldades durante o dia-a-dia,

o Meu Muito Obrigado..

*“ Sem atalhos mergulhei pelos caminhos do saber.
Conheci a inquietude,
o descontentamento,
mas também o fascínio irresistível do maravilhoso.
Pequeno ante o grandioso, grande ante a pequenez do espírito
e a pretensa força dos poderosos,
de tudo me procurei aproximar,
tangido pela atração do desconhecido, do irrealizado.
Não haveria contudo atalho ou caminho,
não estivesse em mim a força, irresistível, do prazer de percorrê-lo.”*

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1 - 2
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	3 - 5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	9 - 12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13 - 30
2.1. Placa e Cárie Dental	13 - 15
2.2. <i>Streptococcus mutans</i>	15 - 17
2.3. Microbiologia da Cárie Radicular.....	17 - 20
2.4. Cárie coronária e Cárie Radicular.....	21 - 23
2.5. Cárie Radicular – Aspectos Clínicos e Histopatológicos	23 - 25
2.6. Cárie Radicular e Doença Periodontal.....	25 - 27
2.7. Análises Genéticas	27 - 30
3. OBJETIVOS	31-32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33 - 44
4.1. Seleção dos Voluntários	33
4.2. Coleta de Dados	33
4.3. Coleta das Amostras	33 – 35

4.4. Provas Bioquímicas	36 - 38
4.5. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR	39 - 42
4.6. Reação em Cadeia da Polimerase com Primers Arbitrários – AP-PCR	42 - 43
4.7. Análise dos Padrões Eletroforéticos	43
4.8. Construção das Matrizes e Dendrogramas de Similaridade	43 - 44
4.9. Análises Estatísticas	44
5. RESULTADOS	45 - 68
5.1. Isolamento Bacteriano	45
5.2. Provas Bioquímicas	46 - 48
5.3. PCR	49- 52
5.4. Comparações: Provas Bioquímicas e PCR	52 - 54
5.5. AP-PCR	54 - 68
6. DISCUSSÃO	69 - 78
7. CONCLUSÕES	79 - 80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81 - 96

LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g/mL}$	= microgramas por mililitro
<i>A. naeslundii</i>	= espécie bacteriana <i>Actinomyces naeslundii</i>
<i>A. viscosus</i>	= espécie bacteriana <i>Actinomyces viscosus</i>
AP-PCR	= Reação em Cadeia da Polimerase com Iniciadores Arbitrários
ATCC	= American Type Culture Collection
BHI	= meio de cultura Brain-Hearth-Infusion
CO_2	= gás dióxido de carbono
dATP	= deoxionucleotídeo adenina trifosfato
dCTP	= deoxionucleotídeo citosina trifosfato
dGTP	= deoxionucleotídeo guanina trifosfato
DNA	= ácido deoxiribonucléico
dTTP	= deoxionucleotídeo timina trifosfato
EDTA	= ácido etileno diaminotetracético
<i>et al.</i>	= e outros (abreviatura de “ <i>et alii</i> ”)
g	= grama
GTF	= enzima glucosiltransferase
<i>gtf</i>	= gene codificador da enzima glucosiltransferase
HCl	= ácido clorídrico
<i>in vitro</i>	= conjunto de reações que se realizam em condições laboratoriais
<i>in vivo</i>	= experimento realizado em seres vivos
Kb	= quilo base
KCl	= cloreto de potássio
<i>L. rhamnosus</i>	= espécie bacteriana <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
M	= molar
MAS	= meio de cultura Ágar Mitis Salivarius
MgCl_2	= cloreto de magnésio
mL	= mililitro
mM	= milimolar
MSB	= meio de cultura Mitis Salivarius Bacitracina

ng	= nanogramas
Taq DNA polimerase	= enzima polimerase proveniente da <i>Thermus aquaticus</i>
°C	= grau Celsius
pb	= pares de bases de DNA
pCO ₂	= pressão parcial do gás dióxido de carbono
PCR	= Reação em Cadeia da Polimerase
pH	= potencial hidrogeniônico
REA	= análise de endonuclease de restrição
q.s.p.	= quantidade suficiente para atingir determinado volume
RAPD	= Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso
rpm	= rotações por minuto
<i>S. cricetus</i>	= espécie bacteriana <i>Streptococcus cricetus</i>
<i>S. ferus</i>	= espécie bacteriana <i>Streptococcus ferus</i>
<i>S. macacae</i>	= espécie bacteriana <i>Streptococcus macacae</i>
<i>S. mitis</i>	= espécie bacteriana <i>Streptococcus mitis</i>
<i>S. mutans</i>	= espécie bacteriana <i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. rattus</i>	= espécie bacteriana <i>Streptococcus rattus</i>
<i>S. sobrinus</i>	= espécie bacteriana <i>Streptococcus sobrinus</i>
SDS	= dodecilsulfato de sódio
SM	= simple matching coefficient
TBE	= tampão Tris-borato- EDTA
TE	= tampão Tris-EDTA
UI	= unidade internacional
UPGMA	= unweighted pair-group method with mathematic avarege

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELA 1:	Sítios de coleta das amostras e suas codificações	34
TABELA 2:	Identificação de estreptococos grupo mutans por provas bioquímicas	38
TABELA 3:	Seqüência dos iniciadores utilizados na técnica de PCR	40
TABELA 4:	Número de colônias isoladas em MSB e provenientes de diferentes nichos da cavidade bucal dos voluntários	45
TABELA 5:	Número de espécies de estreptococos grupo mutans isoladas de diferentes nichos da cavidade bucal de 5 voluntários e identificadas por provas bioquímicas	46
GRÁFICO 1:	Distribuição e freqüência de estreptococos grupo mutans isolados de diferentes nichos da cavidade bucal	47
FIGURA 1:	Cultivo e identificação bioquímica das espécies de estreptococos grupo mutans	47
TABELA 6:	Classificação de biótipos de <i>S. mutans</i> baseada na capacidade de fermentar melibiose e/ou rafinose	48
FIGURA 2:	Amplificação do gene da glucosiltransferase de <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i> pela técnica de PCR, utilizando-se os iniciadores GTFB e GTFI, respectivamente	49
TABELA 7:	Identificação das espécies <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i> pelas reações de PCR ..	50
TABELA 8:	Número de cepas de <i>S. mutans</i> isoladas de diferentes nichos da cavidade bucal de 9 voluntários e identificadas por PCR	50
TABELA 9:	Comparações entre os sítios pesquisados, dois a dois, em relação a espécie <i>S. mutans</i>	51

TABELA 10: Contrastes obtidos pelas comparações entre os sítios de interesse com relação a espécie <i>S. mutans</i>	51
TABELA 11: Número de espécies <i>S. sobrinus</i> isoladas de diferentes nichos da cavidade bucal de 9 voluntários e identificadas por PCR	52
TABELA 12: Comparação entre os resultados das identificações da espécie <i>S. mutans</i> através de provas bioquímicas e PCR	53
TABELA 13: Comparação entre os resultados das identificações da espécie <i>S. sobrinus</i> através de provas bioquímicas e PCR	53
FIGURA 3: Padrões eletroforéticos de <i>S. mutans</i> isolados de sítios da cavidade bucal de um mesmo paciente, obtidos pela técnica de AP-PCR (primer OPA-02)...	54
FIGURA 4: Padrões eletroforéticos similares de <i>S. mutans</i> isolados da cavidade bucal de um mesmo voluntário (primer OPA-02)	55
FIGURA 5: Padrões eletroforéticos de <i>S. mutans</i> isolados das cavidades bucais de dois pacientes (primer OPA-02)	55
FIGURA 6: Padrões eletroforéticos de <i>S. mutans</i> isolados da cavidade bucal de um mesmo paciente (primer OPA-13)	55
TABELA 14: Números de padrões de AP-PCR de <i>S. mutans</i> encontrados em cada sítio pesquisado dos voluntários	56
TABELA 15: Número de perfis genéticos de <i>S. mutans</i> encontrados e número de cepas analisadas pela técnica de AP-PCR	56
FIGURA 7: Dendrograma representativo do agrupamento de perfis genéticos idênticos de <i>S. mutans</i> determinados pela AP-PCR, e ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário 1.....	57

FIGURA 8:	Dendrograma representativo do agrupamento de perfis genéticos idênticos de <i>S. mutans</i> determinados pela AP-PCR, e ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário 2	58
FIGURA 9:	Dendrograma representativo do agrupamento de perfis genéticos idênticos de <i>S. mutans</i> determinados pela AP-PCR, e ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário 3.....	59
FIGURA 10:	Dendrograma representativo do agrupamento de perfis genéticos idênticos de <i>S. mutans</i> determinados pela AP-PCR, e ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário 4.....	60
FIGURA 11:	Dendrograma representativo do agrupamento de perfis genéticos idênticos de <i>S. mutans</i> determinados pela AP-PCR, e ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário 5.....	61
FIGURA 12:	Dendrograma representativo do agrupamento de perfis genéticos idênticos de <i>S. mutans</i> determinados pela AP-PCR, e ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário 6.....	62
FIGURA 13:	Dendrograma representativo do agrupamento de perfis genéticos idênticos de <i>S. mutans</i> determinados pela AP-PCR, e ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário 7.....	63
FIGURA 14:	Dendrograma representativo do agrupamento de perfis genéticos idênticos de <i>S. mutans</i> determinados pela AP-PCR, e ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário 8.....	64
FIGURA 15:	Dendrograma representativo do agrupamento de perfis genéticos idênticos de <i>S. mutans</i> determinados pela AP-PCR, e ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário 9.....	65
FIGURA 16:	Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos de <i>S. mutans</i> ocorrendo nas cavidades bucais dos voluntários, determinados pela AP-PCR	66

RESUMO

Cárie de superfície radicular é um dos principais problemas de saúde bucal em pacientes adultos e idosos. Estudos sugerem uma etiologia comum para cárie radicular e coronária com o envolvimento dos estreptococos grupo mutans na iniciação e progressão destas lesões de cárie. O propósito deste estudo é avaliar a colonização e a distribuição clonal de *Streptococcus mutans* presentes na cavidade oral de indivíduos que apresentam lesões de cárie coronária e radicular. O isolamento e posterior identificação bioquímica desta espécie foi realizado a partir de amostras de saliva, placa dental bacteriana e tecido das lesões de cárie de um mesmo indivíduo. A fim de se confirmar a identidade molecular dos isolados foi utilizada a técnica de PCR com iniciadores específicos para o gene da glucosiltransferase (*gtfB* do *S. mutans* e *gtfI* do *Streptococcus sobrinus*). O polimorfismo genético de *S. mutans* foi pesquisado através da técnica de AP-PCR. Dentre as espécies isoladas e identificadas, *S. mutans* (59,2%) apresentou a maior frequência de isolamento, diferindo significativamente das outras espécies, *S. sobrinus* (15,3%), *Streptococcus ferus* (6,5%) e *Streptococcus cricetus* (5,9%). Os indivíduos estavam colonizados por 2 a 10 genótipos de *S. mutans* distribuídos aleatoriamente entre os sítios pesquisados. A técnica de AP-PCR foi eficaz em demonstrar a variabilidade genética de *S. mutans*, e capaz de diferenciar cepas fermentadoras ou não de melibiose. Diferentes tipos clonais detectados na cavidade oral de um indivíduo com cárie coronária e radicular apresentaram diferentes propriedades fenotípicas (Apoio Financeiro FAPESP, processos nºs: 00/03490-9; 00/06171-1).

ABSTRACT

Dental root caries has been considered a very significant oral health problem in elderly and adults. Studies have suggested a common etiology for root and coronal caries, involving mutans streptococci. The aim of this study was to evaluate the colonization profile and clonal distribution of *Streptococcus mutans* isolated from oral cavity, presenting coronal and root surface caries lesions. The isolation and biochemical identification of this species were carried out using saliva samples, dental plaque, and tissue from caries lesions. In order to confirm their molecular identity, *S. mutans* and *Streptococcus sobrinus* were submitted to the PCR method, using primers specific for portions of the glucosyltransferase genes (*gtfB* and *gtfI*, respectively). The AP-PCR method was used to detect the genetic polymorphism of these species. Among the isolated and identified species, *S. mutans* (59,2%) show the greatest isolation, significantly differing from the other species - *S. sobrinus* (15,3%), *Streptococcus ferus* (6,5%) and *Streptococcus cricetus* (5,9%). Results showed that the subjects harbored two to ten genotypes of *S. mutans*, randomly distributed in different sites. The AP-PCR typing was efficient in demonstrating the genetic variability of the *S. mutans*, and able to distinguish fermenting and non-fermenting bacteria of melibiose. Different clonal types detected in oral cavity presenting coronal and root surface caries lesions can show different phenotypic properties (Supported by FAPESP (Process n°: 00/03490-9; 00/06171-1)).

1. INTRODUÇÃO

A preocupação maior com a higiene oral e o uso de dentifrícios fluoretados permitiram um considerável declínio na prevalência de cárie em esmalte, e o conseqüente aumento do número de indivíduos adultos dentados na população (SEICHTER, 1987; BECK, 1990; 1993; WARREN *et al.*, 2000). A retenção prolongada de dentes na cavidade bucal de pessoas com mais idade, pode resultar num número maior de superfícies radiculares expostas pela recessão gengival devido à hábitos de higiene oral, doença periodontal ou mesmo pelo tratamento periodontal (KATZ, 1982; RAVALD *et al.*, 1986; FURE & ZICKERT, 1990; QUIRYNEN *et al.*, 1999).

A exposição das superfícies radiculares ao ambiente bucal proporciona condições ideais para o aumento das áreas de retenção de placa dental bacteriana e o desenvolvimento de cárie radicular (KELTJENS *et al.*, 1993; VEHKALAHTI & PAUNIO, 1994; WEFEL, 1994). A prevalência de cárie de raiz é, portanto, diretamente relacionada a exposição do cemento e/ou dentina radicular ao meio oral (FURE & ZICKERT, 1990; KELTJENS *et al.*, 1993; FEJERSKOV, 1994).

A partir de 1990, começaram a surgir estudos epidemiológicos transversais e longitudinais sobre modelos de risco de cárie em superfície radicular (BECK, 1990). Entre os estudos biológicos e clínicos destacam-se a ênfase na exposição da superfície radicular (hospedeiro), a dieta cariogênica (substrato) e o controle de placa dental (microbiota específica) interagindo em função do tempo e implicados na formação e

progressão deste tipo de cárie dental (FURE & ZICKERT, 1990; RAVALD & BIRKHED, 1991).

As lesões de cárie radicular têm sido relacionadas a pacientes adultos e idosos, sendo sua prevalência maior em função do aumento da idade (KATZ *et al.*, 1982; KATZ, 1990). Pacientes com dificuldades de manutenção da higiene oral, bem como aqueles sob cuidados médico-hospitalares tendem a desenvolver maior número de lesões (KITAMURA *et al.*, 1986; JONES *et al.*, 1990; MACENTEE *et al.*, 1990). A condição sócio-econômica e cultural também parece determinar uma maior ou menor ocorrência de cárie radicular, considerando-se poder aquisitivo, grau de informação, localização geográfica e acesso ao tratamento odontológico (MESKIN *et al.*, 1990).

Outros indicadores de risco para cárie radicular têm sido descritos: altos números de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* na placa dental e saliva, diminuição da capacidade tampão da saliva e diminuição do nível de secreção salivar (ELLEN *et al.*, 1985; BECK, 1990), fumo, altas quantidades de placa dental e alto consumo de açúcar (KELTJENS *et al.*, 1987; FURE & ZICKERT, 1990; RAVALD & BIRKHED, 1991).

Ainda não há um consenso sobre quais são os microrganismos responsáveis pela iniciação e progressão da cárie radicular, no entanto, determinadas espécies são mais correlacionadas à este tipo de cárie dental, incluindo principalmente estreptococos cariogênicos, como *S. mutans* e *S. sobrinus*, bem como certas espécies de *Actinomyces*. É possível que outras espécies possam causar cárie em superfície radicular, seja diretamente pela produção de ácidos orgânicos que desmineralizam o dente ou

indiretamente pela participação na formação de um complexo microbiano presente na placa dental (ZAMBON & KASPRZAK, 1995).

Streptococcus mutans e *S. sobrinus* são espécies de estreptococos grupo mutans implicadas na iniciação e progressão do processo de cárie dental. Vários métodos têm sido utilizados para diferenciar e identificar estes microrganismos, incluindo análises da morfologia das colônias (GOLD *et al.*, 1973), testes bioquímicos (KRAL & DANEOMORE, 1981; BEIGHTON *et al.*, 1991; LIEBANA *et al.*, 1993), métodos imunológicos (HAMADA & SLADE, 1980; de SOET *et al.*, 1991) e métodos genéticos (SMORAWINSKA & KURAMITSU, 1992; CANGELOSI *et al.*, 1994; IDA *et al.*, 1999). Cada um destes métodos possui aplicações e vantagens específicas.

A possível variabilidade entre os estreptococos orais presentes em superfícies dentais saudáveis e lesões de cárie em um mesmo indivíduo foi sugerida precocemente pelo uso de métodos fenotípicos (KELSTRUP *et al.*, 1970). Os resultados de estudos com tipagem molecular confirmam a existência de uma variabilidade genética inter e intra-espécies que colonizam a cavidade bucal dos indivíduos, embora não tenham analisado comparativamente superfícies dentais saudáveis e cariadas. Nestes estudos, a heterogeneidade genética é observada entre espécies presentes apenas na saliva, placa dental e dorso de língua, ou mesmo referem-se a transmissibilidade vertical ou horizontal de bactérias orais (GRÖNROOS & ALALUUSUA, 2000; EMANUELSSON, 2001; MATTOS-GRANER *et al.*, 200; PAN *et al.*, 2001).

A aplicação da técnica de AP-PCR, em estudos de clonalidade individual ou familiar envolvendo estreptococos orais foi proposta por estudos como o de ALALUUSUA *et al.* (1996), SAARELA *et al.* (1996), LI & CAUFIELD (1998), TRUONG *et al.* (2000) e GRÖNROOS & ALALUUSUA (2000). Em grande parte destes estudos, é constatado que um ou mais perfis genéticos de estreptococos grupo mutans podem ser encontrados em um mesmo indivíduo.

Embora os mecanismos de colonização e acúmulo bacteriano em superfícies dentais não estejam totalmente esclarecidos, estudos como o de MATTOS-GRANER *et al.* (2001) sugerem que em adição a fatores relacionados ao ambiente oral e ao hospedeiro, genótipos específicos de *S. mutans* podem ser considerados colonizadores mais agressivos. Desta forma, torna-se importante um melhor esclarecimento sobre a diversidade genética de espécies bacterianas orais e sua associação com o processo de colonização e desenvolvimento de cárie em superfícies dentais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Placa e Cárie Dental

A placa dental pode ser definida como um filme de microrganismos formado naturalmente sobre superfícies dentais e embebido em uma matriz de polímeros de origem salivar e bacteriana (MARSH, 1991). A presença de placa dental é geralmente considerada benéfica, desde de que contribui para defesa inicial do hospedeiro, agindo como barreira para colonização das superfícies por microrganismos exógenos e freqüentemente patogênicos (MARSH, 1989).

As atividades particulares das espécies bacterianas que compõem a placa dental podem ser influenciadas por fatores relacionados tanto ao hospedeiro, tais como fatores bioquímicos, fisiológicos e anatômicos, bem como por fatores relacionados ao ambiente bucal, como dieta e outras espécies bacterianas presentes (SIMMONDS *et al.*, 2000).

Procurando descrever a relação entre placa dental bacteriana e doença cárie algumas teorias foram inicialmente propostas. Desde 1890, quando MILLER apresentou a teoria químico-parasitária da cárie dental, este processo é considerado como o resultado da descalcificação da superfície dental pela ação de ácidos produzidos por microrganismos fermentadores de carboidratos presentes na placa dental (LOESCHE, 1986). Tal conceito foi associado a hipótese da placa inespecífica, onde é admitido que várias espécies heterogêneas de organismos podem atuar na etiologia da cárie dental.

Em contraste, a hipótese da placa específica proposta por LOESCHE (1976) considera que dentre um grande número de microrganismos que compõem a microbiota da placa dental, somente um número limitado, denominados “odontopáticos”, estariam envolvidos no processo de cárie.

Em alguns aspectos essas hipóteses podem ser associadas, desde que a doença cárie é essencialmente uma infecção causada por interações de bactérias, sendo no entanto evidente a predominância de certas espécies. Posteriormente foi proposto por MARSH (1991) o termo “hipótese de placa ecológica”, onde foi aceito que um ou mais fatores podem alterar as proporções da microbiota residente e predispor um determinado local ao processo carioso.

BRADY *et al.* (1992) descreveram o processo de colonização das diferentes superfícies expostas da cavidade bucal, incluindo os dentes, tecidos periodontais e língua, como sendo realizado por populações distintas de bactérias. De acordo com os autores, a afinidade de uma espécie para um determinado nicho pode ser influenciada por sua especificidade de aderência a determinados substratos, especialmente no caso dos colonizadores iniciais da cavidade bucal.

Os estreptococos grupo mutans são espécies bacterianas intimamente relacionadas aos processos de formação de placa e cárie dental. Estas espécies se estabelecem na cavidade bucal pela modulação de um grupo complexo de fatores, incluindo o número de dentes irrompidos (CAUFIELD *et al.*, 1993), interações bacterianas, níveis de estreptococos orais e outras espécies presentes, capacidade imunológica

(SMITH *et al.*, 1998) e consumo de sacarose (van HOUTE *et al.*, 1982). Estes fatores podem influenciar a colonização da cavidade bucal por estreptococos grupo mutans, explicando variações quanto a frequência e distribuição destes microrganismos observadas em diferentes populações (FUJIWARA *et al.*, 1991; CAUFIELD *et al.*, 1993; MATTOS-GRANER *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2000), bem como diferentes locais da cavidade bucal (HOHWY *et al.*, 2001; EMANUELSSON, 2001).

2.2. *Streptococcus mutans*

A existência de diferenças sorológicas entre as cepas de *S. mutans* foi primeiramente observada por ZINNER & JABLON (1968). Posteriormente, BRATTHALL (1970) dividiu as cepas de *S. mutans* em cinco grupos baseados na presença de cinco diferentes antígenos específicos (grupos sorológicos de a - e).

COYKENDALL, em 1970, demonstrou a existência de grupos genéticos distintos (I a V) baseado em variações na constituição das bases de DNA entre cepas de *S. mutans* isoladas de ratos selvagens, levando o mesmo autor a propor subespécies de *S. mutans*. Posteriormente, esses genótipos foram correlacionados com os sorotipos descritos, sendo demonstrado que – dentre um genótipo – diferentes sorotipos e propriedades bioquímicas poderiam ocorrer.

Buscando uma melhor classificação das espécies de estreptococos grupo mutans, um novo esquema bioquímico foi proposto por SHKLAIR & KEENE (1974), baseado em provas de fermentação de açúcares, como manitol, sorbitol, rafinose, melibiose e na habilidade em produzir amônia a partir do substrato arginina. Assim,

através de características bioquímicas e sorológicas foram descritas cinco espécies pertencentes ao grupo mutans de estreptococos: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus* e *Streptococcus ferus*.

BEIGHTON *et al.* (1984) isolaram um sorotipo adicional, *Streptococcus macacae* (sorotipo c), a partir da placa dental de macacos e propuseram sua inclusão no grupo mutans. Finalmente, WHILEY *et al.* (1988) descreveu *Streptococcus downei* (sorotipo h), representando mais uma espécie distinta pertencente ao grupo mutans.

A presente classificação dos estreptococos orais inclui estes microrganismos em quatro grupos: anginosus, mitis, salivarius e mutans. A classificação é baseada em dados quimiotaxonômicos e genotípicos, especialmente em análises das bases de DNA e da sequência do gene 16S rRNA (WHILEY & BEIGHTON, 1998). As espécies do grupo mutans são as mais freqüentemente relacionadas ao processo de cárie dental, sendo *S. mutans* (sorotipo c, e, f) e *S. sobrinus* (sorotipo d, g) as mais comumente encontradas na cavidade bucal de humanos (HAMADA & SLADE, 1980).

As espécies representativas de *Streptococcus mutans* são fenotipicamente homogêneas (HAMADA & SLADE, 1980), porém investigações recentes têm revelado certo grau de heterogeneidade entre estas espécies quanto as suas características genéticas e antigênicas (MAIDEN *et al.*, 1992; OHO *et al.*, 2000). Recentemente, uma cepa isolada da cavidade bucal de ratos, denominada *Streptococcus orisratti*, foi incluída no gênero *Streptococcus* baseado em suas características físicas, bioquímicas e genéticas, sendo considerada morfologicamente similar aos estreptococos grupo mutans

em placas de Ágar Mitis Salivarius - MSA (ZHU *et al.*, 2000). Estudos futuros poderão esclarecer melhor sua filogênia e avaliar o potencial cariogênico desta nova espécie.

O papel central dos *S. mutans* no desenvolvimento da cárie dental humana já está bem estabelecido (LOESCHE, 1986), e este fato se deve principalmente a sua grande habilidade adesiva e ácido-secretora (HIROSE *et al.*, 1993). *Streptococcus mutans* possuem enzimas glucosiltransferases que sintetizam polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose. Os polissacarídeos podem mediar a colonização destas espécies em superfícies dentais, resultando numa placa dental cariogênica onde bactérias acidogênicas e ácido-tolerantes podem crescer (WEXLER *et al.*, 1993).

Streptococcus mutans produzem três tipos de glucosiltransferases (GTF-I, GTF-SI e GTF-S), e o gene *gtfB* codificador da GTF-I, que sintetiza primariamente glucanos insolúveis em água a partir da sacarose (SHIROZA *et al.*, 1987; HONDA *et al.*, 1990). *S. sobrinus* possuem quatro tipos de glucosiltransferases (GTF-I, GTF-S, GTF-SA e GTF-SB), e o gene *gtfI* que codifica GTF-I, sintetizadora de glucanos insolúveis.

2.3. Microbiologia da Cárie Radicular

Os primeiros estudos microbiológicos sobre cárie radicular em humanos enfatizaram a presença de espécies bacterianas específicas, diferentes daquelas associadas a cárie coronária (JORDAN & HAMMOND, 1972; SUMNEY & JORDAN, 1974). Este conceito foi alimentado pela predominância de bactérias filamentosas na região radicular de dentes humanos extraídos e na placa dental sobreposta às lesões radiculares. Os achados sugeriam que o ambiente próximo às superfícies radiculares

permitiria de alguma forma o surgimento de uma microbiota associada ao periodonto e relacionada à proteólise, diferindo daquela encontrada na superfície do esmalte dental.

Estudos prévios (SOCRANSKY *et al.*, 1970; JORDAN & HAMMOND, 1972; SUMNEY & JORDAN, 1974; SYED *et al.*, 1975) focalizaram o gênero *Actinomyces* como importante causador da cárie radicular. SOCRANSKY *et al.* (1970) demonstraram que as espécies *Actinomyces naeslundii* e *Actinomyces viscosus* isoladas a partir de lesões de cárie radicular em humanos eram capazes de induzir cárie radicular em animais “livres de germes”.

A ampla distribuição da espécie *A. viscosus* tanto em superfícies cariadas como em superfícies livres de cárie, desafiou as tentativas de envolvê-la na etiologia da cárie radicular apenas por associação numérica, uma vez que a evidência mais forte para o significado etiológico de uma espécie seria sua maior associação com os estágios patológicos da doença que com os sadios (ELLEN *et al.*, 1985; BROWN *et al.*, 1986; KELTJENS *et al.*, 1987; EMILSON *et al.*, 1988; BOWDEN, 1990). Segundo van HOUTE *et al.* (1990), o aumento do número de *Actinomyces* não é um bom preditor para a presença de cárie radicular, pois a quantidade elevada desses microrganismos na superfície radicular independe do risco e atividade de cárie.

Durante os últimos 20 anos, foram realizadas várias comparações transversais com raízes cariadas e sadias. A maior parte destes estudos sugeriu uma associação maior dos estreptococos grupo mutans com raízes cariadas que com sadias (BROWN *et*

al., 1986; KELTJENS *et al.*, 1987; EMILSON *et al.*, 1988; BOWDEN, 1990; van HOUTE *et al.*, 1990).

A superfície da raiz mostra-se progressivamente colonizada por *S. mutans*, em função do risco e atividade de cárie (RAVALD *et al.*, 1986; van HOUTE *et al.*, 1990), e também o aumento de *Lactobacillus* parece estar relacionado ao desenvolvimento de cárie nestas superfícies em virtude da sua associação com *S. mutans* (RAVALD *et al.*, 1986; LYNCH & BEIGHTON, 1994).

Em 1985, ELLEN *et al.* realizaram um estudo longitudinal com pacientes hospitalizados, onde foi analisada a microbiota de superfícies radiculares cariadas e livres de cárie. Os autores concluíram que superfícies radiculares colonizadas por *S. mutans* e *Lactobacillus* apresentam grande risco de desenvolver cáries.

A etiologia microbiana da cárie radicular pode também ser correlacionada com os diferentes estágios das lesões. KELTJENS *et al.* (1987) classificaram as lesões radiculares como amolecidas ou rígidas e encontraram altos números de *S. mutans* em lesões amolecidas. Posteriormente BEIGHTON *et al.* (1993) caracterizaram uma parte da microbiota de lesões radiculares em diferentes estágios de progressão e puderam encontrar um isolamento freqüente de *S. mutans*, *Lactobacillus* e fungos em lesões ativas.

SCHÜPBACH *et al.* (1995) procuraram quantificar e qualificar a microbiota total cultivável da placa dental sobreposta a superfícies radiculares sadias, cariadas e lesões da cárie incipientes de cinco dentes humanos extraídos. As bactérias Gram-positivas predominantemente anaeróbias facultativas, gênero *Streptococcus*, *Staphylococcus*,

Lactobacillus e *Actinomyces*, anaeróbias Gram-negativas, predominantemente *Bacteroides*, *Prevotella*, *Selenomonas*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia* e *Capnocytophaga*, apresentaram alta frequência de isolamento. Esses achados suportam a teoria da etiologia polimicrobiana para iniciação da cárie em superfícies radiculares.

SCHÜPBACK *et al.* (1996) estudaram a microbiota presente em 14 lesões de cárie radicular e enfatizaram a sucessão da população bacteriana que ocorre durante a progressão da lesão. Estruturalmente, as lesões foram caracterizadas pela desmineralização parcial do cemento que precede a invasão bacteriana. Os autores sugeriram que primeiro o colágeno é desnaturado em meio ácido e então degradado por enzimas proteolíticas derivadas de bactérias Gram-negativas presentes na placa superficial as lesões. A partir deste ponto, espécies como *A. viscosus* perdem sua vantagem etiológica, e segue-se a sucessão bacteriana caracterizada pelo predomínio de espécies acidúricas e acidogênicas.

Em 1998, SHU divulgou um novo modelo laboratorial para o estudo de cáries em esmalte e raiz. Este modelo consistia em um biofilme contendo um conjunto de quatro espécies que desenvolveram cárie em uma “cavidade bucal artificial”: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *A. naeslundii* e *Lactobacillus rhamnosus*, ou seis: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Streptococcus mitis*, *A. naeslundii*, *L. rhamnosus* e *Veillonella dispar*. Lesões de cárie similares às aquelas desenvolvidas *in vivo* foram produzidas em blocos de esmalte, dentina e tecido radicular intacto por estes grupos de microrganismos mais efetivamente do que em biofilmes de espécies individuais.

2.4. Cárie coronária e Cárie radicular

Estudos têm sido realizados com o objetivo de estabelecer ou não uma relação entre cárie de superfície coronária e radicular. SUMNEY *et al.* (1973) observaram que 60% dos dentes afetados por cárie na superfície radicular não mostraram nenhuma evidência de ataque prévio de cárie coronária, enquanto SCHAMSCHULA *et al.* (1974) citado por SEICHTER (1986) apresentaram uma relação positiva entre a ocorrência destes dois tipos de cárie dental.

BANTING *et al.* (1980) concluíram que a cárie de superfície radicular é positivamente associada à experiência de cárie coronária. No entanto, este mesmo grupo de pesquisadores, em continuidade ao estudo anterior, verificaram que as pessoas que desenvolveram novas lesões de cárie radicular após 34 meses, possuíam valores mais baixos de experiência de cárie de esmalte (ELLEN *et al.*, 1985).

NYVAD & KILIAN (1987) realizaram um estudo sobre a microbiota responsável pela colonização inicial das superfícies de esmalte e raiz *in vivo*. Os autores chamaram a atenção para a existência de uma considerável variação interindividual da composição bacteriana. Entretanto, não foram observadas diferenças quanto a microbiota inicial colonizadora das superfícies de esmalte comparada às superfícies radiculares.

Em um estudo com indivíduos de 65 anos ou mais, HAND *et al.* (1988) concluíram que a probabilidade de desenvolver cárie coronária estava significativamente associada ao desenvolvimento de cárie radicular. FURE & ZICKERT (1990) realizaram uma pesquisa com pessoas aos 55, 65 e 75 anos, onde também foi demonstrado que a

freqüência de cárie coronária estava fortemente correlacionada com a freqüência de cárie em superfície radicular.

No entanto, REIKER *et al.* (1999) não encontrou correlação entre o número de lesões radiculares e lesões coronárias restauradas ou não. Foi possível verificar também neste estudo, que lesões em superfícies radiculares podem ocorrer na ausência de história anterior de cárie coronária. Segundo HOPPENBROUWERS *et al.* (1987), uma explicação para a falta de correlação pode ser a maior solubilidade do cimento e dentina comparada com a do esmalte dental. Este fenômeno torna a raiz dental mais suscetível a cárie, desta forma a ocorrência de cárie coronária em um indivíduo, não é necessariamente um indicador para o desenvolvimento de cárie radicular.

A prevalência de cárie dental e os cuidados com higiene oral em pacientes idosos foi recentemente divulgada pelo estudo de WARREN *et al.* (2000). A população estudada foi composta por indivíduos com idade entre 79 e 101 anos, dentre os quais 96% apresentavam experiência de cárie coronária e 64% dos indivíduos apresentavam experiência de cárie radicular. Os achados deste estudo sugerem que embora sejam evidentes altos níveis de cuidados dentais entre os indivíduos que possuem dentes naturais remanescentes, cárie coronária e radicular permanecem prevalentes em pacientes idosos.

Embora existam várias tentativas conflitantes de determinar uma etiologia microbiana única para cárie radicular, há pouca evidencia que diferencie sua patogênese da cárie coronária. Alguns estudos sugerem que a etiologia de ambas: cárie radicular e

coronária seja a mesma, com *S. mutans* e *Lactobacillus* envolvidos no processo de iniciação das lesões de cárie (BANTING *et al.*, 1980; BURT *et al.*, 1986; FURE & ZICKERT, 1990; BOWDEN, 1990).

2.5. Cárie Radicular – Aspectos Clínicos e Histopatológicos

A cárie de superfície radicular tem aflingido o homem desde a antigüidade. Segundo KIDD (1989), pesquisas antropológicas em populações antigas mostraram que a cárie dental foi um problema de saúde considerado pequeno, porém a maioria das lesões de cárie desenvolviam-se em superfícies radiculares.

Estudos realizados com crânios de populações anglo-saxãs do século VI por CORBETT & MOORE (1976), demonstraram uma predominância de “cárie de cimento” ocorrendo na junção cimento-esmalte durante a idade adulta, particularmente nas “superfícies intersticiais”, sendo incomuns em adolescentes. Nesta época, a cárie de esmalte ocorria de forma menos intensa, sendo este fato atribuído a hábitos dietéticos que não incluíam a ingestão freqüente de sacarose.

As primeiras definições clínicas de cárie radicular foram propostas por autores como ABBOT (1879) citado por HAZEN *et al.* (1973), que descreveu a cárie de “cimento” como um processo inflamatório no qual este tecido dental torna-se inflamado e desintegrado. As características clínicas das lesões de cárie radicular foram posteriormente descritas por SUMNEY *et al.* (1973) como cavidades na estrutura dentária abaixo da junção cimento-esmalte e que não envolvem o esmalte adjacente.

De acordo com NYVAD & FEJERSKOV (1997), o diagnóstico clínico da cárie de superfície radicular pode compreender desde um pequeno ponto levemente amolecido e de coloração alterada na raiz - lesões incipientes - até extensas áreas amolecidas, de coloração marrom-escura ou preta, envolvendo quase toda a superfície da raiz exposta - lesões avançadas. Lesões ativas em estágios iniciais são predominantemente amarelas ou marrom-claras, recobertas por uma placa bacteriana de espessura variada e amolecidas à leve sondagem. BEIGHTON & BRAILSFORD (1999) descreveram a cárie radicular como um tipo de cárie dental que é iniciada na dentina exposta de superfícies radiculares e usualmente em associação com acúmulo de placa supragengival.

Quanto a histopatologia das lesões radiculares, as primeiras investigações realizadas por FURSETH & JOHANSEN (1968) utilizaram técnicas de microradiografia em dentes humanos extraídos e demonstraram a freqüente presença de uma camada radiopaca na superfície do cimento, particularmente após contato prévio com fluídos orais devido a recessão gengival. Recentemente, McINTYRE (2000) estudou o papel do cimento e o efeito de sua remoção na progressão da cárie de superfície radicular induzida artificialmente. As observações sugerem que a camada de cimento providencia uma inibição inicial na desmineralização da superfície, impedindo o influxo de íons (provenientes do ácido láctico e acético) e retardando o efluxo dos produtos de dissolução dos cristais de hidroxiapatita.

É preciso salientar no entanto que a presença de uma camada intacta de cimento recobrindo a abertura dos túbulos dentinários, observada em estudos realizados *in vitro*, pode apresentar uma diferença significativa da situação *in vivo*, onde na maioria

dos casos o cimento exposto a cavidade bucal é rapidamente perdido, e o aspecto clínico da superfície radicular é geralmente associado ao contato direto da dentina aos fluídos orais (FIRESTONE *et al.*, 1993).

Devido à composição mineral do cimento e dentina, o pH crítico de dissolução da raiz aproxima-se de 6,7, tornando-a mais susceptível que o esmalte (pH crítico 5,5) à solubilização por ácidos produzidos por bactérias orais (HOPPENBROWERS *et al.*, 1987; YOUNGS, 1994). Assim especula-se que frente a um mesmo desafio cariogênico, o risco de desenvolvimento de cárie radicular é maior que o de cárie coronária (PHANKOSOL *et al.*, 1985).

As lesões radiculares apresentam um padrão de progressão e desmineralização peculiar, demonstrando grande extensão superficial e pouca profundidade. NYVAD & FEJERSKOV (1982) afirmaram que a evolução da cárie radicular é lenta, apesar da solubilidade do cimento e da dentina ser alta, e a penetração bacteriana ser mais intensa. Esse fato pode ser explicado pelo menor número de túbulos dentinários na dentina radicular e pela sua maior mineralização em função da idade. Apesar disto, FEATHERSTONE (1994) observaram uma reação de difusão ácida similar à observada em esmalte dental.

2.6. Cárie Radicular e Doença Periodontal

Uma correlação positiva entre a prevalência de cárie radicular e doença periodontal tem sido abordada por muitos autores (BANTING *et al.*, 1980; RAVALD & BICKERD, 1991; RAVALD *et al.*, 1993). Em um estudo longitudinal de 12 anos, RAVALD

et al. (1993), puderam investigar a susceptibilidade individual para o desenvolvimento de cárie de raiz em pacientes com doença periodontal. Este estudo pode indicar claramente que a cárie radicular pode ocorrer, em menor extensão, em pacientes que demonstram boas condições de higiene oral após terapia periodontal.

VEHKALAHTI & PAUNIO, em 1994, examinaram clinicamente uma amostra representativa de adultos finlandeses com idade acima de 30 anos. Pacientes com saúde periodontal (4%) não apresentaram nenhuma superfície radicular cariada, entretanto foi encontrado 15% de cárie radicular em conjunção com inflamação gengival e 17% em conjunção com bolsa periodontal. A presença de placa subgengival mostrou-se um forte fator relacionado a ocorrência de cárie nesta região.

REIKER *et al.* (1999) realizaram um estudo seccional, onde foi investigada a prevalência e os riscos de cárie radicular em 45 pacientes com problemas periodontais que mantinham tratamento ativo. Foram encontradas em média 4,3 lesões radiculares por paciente, entretanto este número foi considerado baixo considerando-se o grande número de locais com recessão gengival. Os resultados indicaram que cárie radicular pode ser uma complicação em pacientes periodontais, e ainda que o número individual de lesões correlaciona-se com a capacidade de formação de placa dental e alta contagem salivar de *S. mutans*, não existindo correlação entre experiência de cárie radicular e cárie coronária, nível de secreção ou capacidade tampão da saliva.

No estudo de QUIRYNEN *et al.* (1999), dez pacientes com periodontite severa foram acompanhados durante 8 meses após o início do tratamento, que consistiu em

raspagem e alisamento radicular em combinação com controle rigoroso de formação de placa dental. Os resultados indicaram que o aumento da susceptibilidade após a terapia periodontal pode ser parcialmente explicado pelo aumento do número de *S. mutans*, decorrente de mudanças na microbiota intra-oral durante a fase inicial da terapia periodontal, de periodonto-patógenos para uma microbiota mais acidogênica.

Van DER REIJDEN *et al.* (2001) procuraram investigar a presença de estreptococos grupo mutans em placa subgengival de 154 pacientes em diferentes estágios de doença periodontal. A prevalência de *S. mutans* variou entre 82% em pacientes não tratados a 94% em pacientes em tratamento. De acordo com os autores, o sulco subgengival pode ser considerado um nicho ecológico para *S. mutans*, sendo este fator importante para o desenvolvimento de cárie radicular em pacientes periodontais.

2.7. Análises Genéticas

Testes bioquímicos como fermentação de açúcares e atividades enzimáticas são rotineiramente utilizados para identificação de espécies bacterianas orais (LIEBANA *et al.*, 1993). Embora estas propriedades fenotípicas pareçam ser estáveis e aceitáveis, estes testes são dificilmente satisfatórios para identificar 100% dos isolados. Entretanto, métodos de genética molecular objetivando genes específicos têm sido efetivamente utilizados para se obter uma identificação mais acurada (SMORAWINSKA & KURAMITSU, 1992; CANGELOSI *et al.*, 1994; COLBY *et al.*, 1995; IDA *et al.*, 1999).

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizada na detecção e identificação de estreptococos grupo mutans, bem como de outras bactérias orais

(COLBY, 1995; IGARASHI *et al.*, 1998; ALAM *et al.*, 2000), envolve a síntese *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima *Taq* DNA polimerase. A amplificação enzimática decorre do anelamento de iniciadores (iniciadores) que delimitam as seqüências do DNA de dupla fita, que se deseja amplificar (SAIKI *et al.*, 1988; IGARASHI *et al.*, 1998). Esses iniciadores são sintetizados artificialmente, de modo que as seqüências de nucleotídeos sejam complementares aquelas que flanqueiam a região que será amplificada.

Dentre as diferentes aplicações da PCR, a técnica de AP-PCR (Reação da Cadeia em Polimerase com Iniciadores Arbitrários) é aplicada em caracterizações genotípicas de diferentes espécies bacterianas (WELSH & McCLELLAND, 1990; LI & CAUFIELD, 1998). A maior vantagem da AP-PCR é que não se faz necessário o conhecimento prévio da seqüência de DNA alvo da espécie bacteriana. Nesta técnica, somente um único primer arbitrário é empregado, enquanto na técnica de PCR clássica, dois iniciadores que codificam uma seqüência conhecida são empregados (WELSH & McCLELLAND, 1990).

WILLIAMS *et al.* (1990) relataram que a diferença de apenas um par de bases (mutações pontuais) são suficientes para causar a não complementaridade do “primer” com a fita molde, o que impede a amplificação do segmento. Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções ou inserções nos sítios de ligação do “primer”, que aumentam as distâncias a serem percorridas pela *Taq* polimerase. Desta forma, o polimorfismo genético detectado através dos marcadores RAPD (Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso) tem uma natureza binária, podendo o segmento amplificado estar

presente ou ausente. O aparecimento de bandas eletroforéticas permite a observação da natureza molecular do polimorfismo genético pesquisado.

Métodos de tipagem genética como análises de polimorfismos de fragmentos de DNA têm revelado considerável heterogeneidade genética entre estreptococos grupo mutans. Indivíduos epidemiologicamente não relacionados podem apresentar diferentes clones destes estreptococos, bem como em um mesmo indivíduo é possível encontrar mais de um genótipo de uma mesma espécie (CAUFIELD & WALKER, 1989; KULKARNI *et al.*, 1989; KOZAI *et al.*, 1991; SAARELA *et al.*, 1993; ALALUUSUA *et al.*, 1994).

SAARELA *et al.* (1996) propuseram o emprego da técnica de AP-PCR na análise de diferentes espécies e sorotipos de estreptococos orais. Neste estudo, a tipagem por AP-PCR foi realizada em 127 isolados de *S. mutans* e *S. sobrinus* obtidos de 65 indivíduos (1-10 por indivíduo). Os dois iniciadores arbitrários utilizados, OPA-05 e OPA-13, provaram ser adequados para distinguir os isolados bacterianos. A aplicação da AP-PCR foi capaz de diferenciar *S. mutans* e *S. sobrinus*, mas nenhum dos iniciadores detectou diferenças sorotipo-específicas.

Determinar se duas espécies bacterianas são únicas, idênticas ou clones relacionados, depende da comparação de suas particularidades fenotípicas e genotípicas. Este princípio foi proposto por LI & CAUFIELD (1998) para avaliar a técnica AP-PCR na caracterização molecular de isolados de *S. mutans*. Catorze espécies foram isoladas em meio de cultura específico (MSB) e confirmadas bioquimicamente como pertencentes ao grupo mutans. O primer utilizado, OPA-02, foi capaz de gerar 8 a 12 amplicons

discerníveis e reproduzíveis do DNA dos *S. mutans*. Os autores concluíram que as impressões gênicas geradas pelo AP-PCR são capazes de detectar o polimorfismo entre diferentes isolados de *S. mutans*, e providenciar vantagens para os estudos de epidemiologia molecular e particularidades de virulência.

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

GRÖNROOS & ALALUUSUA (2000) utilizaram a técnica de AP-PCR para avaliar 50 amostras de placa dental e saliva provenientes da cavidade bucal de 7 crianças. Os isolados foram testados quanto a sua capacidade de fermentar manitol, sorbitol e melibiose. Dos 598 isolados, 13 padrões de AP-PCR representativos de *S. mutans* e 2 padrões de AP-PCR representativos de *S. sobrinus* foram encontrados. Duas crianças apresentaram-se colonizadas por genótipos de *S. mutans* fermentadores e não fermentadores do açúcar melibiose que puderam ser distinguidos pela técnica de AP-PCR. Esta análise da diversidade clonal em um mesmo indivíduo apresentou que as crianças foram colonizadas por um, dois, três ou quatro perfis de *S. mutans*, e que a frequência de distribuição dos genótipos difere com relação aos diferentes locais de isolamento da cavidade bucal.

3. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos:

- ✓ Avaliar o perfil de colonização dos estreptococos grupo mutans presentes em diferentes sítios da cavidade bucal de um mesmo indivíduo.
- ✓ Avaliar a eficiência da técnica de AP-PCR para a detecção do polimorfismo genético de *S. mutans*.
- ✓ Verificar a possível correlação entre a presença e distribuição clonal desta espécie e os tipos de lesões cariosas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Seleção dos Voluntários

Foram selecionados nove pacientes de ambos os sexos e distribuídos pela faixa etária de 50 a 75 anos. Os pacientes encontravam-se em tratamento na Clínica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP) e apresentavam na cavidade bucal: dente(s) com recessão gengival e coroa íntegra, dente(s) com cárie coronária e dente(s) com cárie radicular. Não participaram do processo de seleção os pacientes fumantes, ou com algum tipo de envolvimento sistêmico, assim como aqueles que fizeram uso de antibióticos nos últimos seis meses.

4.2 - Coleta de Dados

Após assinarem o Termo de Livre Consentimento aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP (parecer nº: 44-2001, ANEXO 1), foram realizados os exames anamnésico e clínico dos pacientes selecionados. Os exames, bem como a coleta das amostras, foram realizados na Clínica de Graduação da FOP-UNICAMP.

4.3 - Coleta das Amostras

Inicialmente, foi solicitado à todos os voluntários que dispensassem saliva não estimulada em tubos de rosca previamente esterilizados, até quantidade aproximada de 1 mL. Com o auxílio de uma cureta esterilizada com capacidade para obtenção de 1 mg de placa, foi coletada placa dental dos seguintes sítios de cada voluntário:

- coroa hígida e raiz exposta de um mesmo dente;

- superficial a lesão de cárie coronária;
- superficial a lesão de cárie radicular;

Após a coleta, as placas dentais foram cuidadosamente removidas das superfícies cariadas, com o auxílio de uma escova de dente e água destilada, ambas esterilizadas (BEIGHTON *et al.*, 1993). A presença de placa bacteriana acima da lesão pode modificar significativamente o número de microrganismos e a composição da microbiota presente na dentina cariada, o que torna necessário a sua completa remoção (BEIGHTON & BRAILSFORD, 1999). O tecido cariado das lesões coronária e radicular foram subseqüentemente coletados com uma cureta estéril.

As lesões de cárie incluídas no presente estudo, foram diagnosticadas como sendo lesões ativas, de coloração amarelada, amolecidas à sondagem e diâmetro não maior que 3 mm. Sendo as cáries coronárias situadas em superfícies lisas e as cáries radiculares localizadas abaixo da junção cimento-esmalte em superfícies radiculares expostas. A TAB. 1 apresenta os sítios de coleta das amostras e suas respectivas codificações.

TABELA 1: Sítios de coleta das amostras e suas codificações

Sítios de coleta	Codificação
Saliva	S
Placa superficial a coroa hígida	PC
Placa superficial a lesão coronária	PLC
Tecido cariado da lesão coronária	TC
Placa superficial a raiz hígida	PR
Placa superficial a lesão radicular	PLR
Tecido cariado da lesão radicular	TR

As amostras foram transportadas imediatamente ao laboratório de Microbiologia (FOP-UNICAMP), e submetidas a 1 minuto de vibração em um agitador de tubos (Phoenix - AT 56). Em seguida, as mesmas foram diluídas em série decimal de 10^{-1} a 10^{-3} em solução salina a 0,9%.

Para o cultivo dos estreptococos grupo mutans, alíquotas de 5 μ L de cada diluição foram inoculadas em placas de Petri, contendo meio de cultura Mitis Salivarius Bacitracina (MSB). Após incubação a 37°C por 48 horas em atmosfera com pCO₂ de 10% (Water-Jacked CO₂ Incubators/ Cole Parmer Instruments - USA) foi coletado um número variável de colônias de cada sítio.

As colônias foram transferidas individualmente para um tubo de cultura contendo caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas em condições ótimas para seu desenvolvimento celular (37°C, pCO₂ 10%, 24 horas). Após o crescimento e verificação da pureza através da visualização da coloração de Gram, todas as colônias foram estocadas em glicerol 10% à - 80°C.

Com o objetivo de comparar os métodos de identificação por provas bioquímicas e por PCR, os isolados bacterianos de cinco voluntários foram submetidos a identificação por esses dois métodos.

4.4 - Provas Bioquímicas

Anteriormente a realização das provas bioquímicas, as espécies isoladas foram subcultivadas em BHI a 37°C e posteriormente em MSA, a fim de se constatar a presença de possível contaminação entre os isolados.

A identificação das cepas de estreptococos grupo mutans foi realizada através das provas bioquímicas: fermentação de manitol, sorbitol, melibiose e rafinose; hidrólise de arginina; produção de peróxido de hidrogênio e sensibilidade à bacitracina (HARDIE, 1986). Em cada prova bioquímica, além das amostras a serem pesquisadas foram também utilizadas cepas padrões de *S. mutans* (ATCC 25175) e *S. sobrinus* (Ib 6715).

Os testes de fermentação dos açúcares foram realizados em meio sólido, constituído de caldo de tioglicolato sem dextrose e sem indicador (Difco), acrescido de bacto-ágar (Difco) na concentração final de 1,5% e 0,0016% de púrpura de bromocresol (Inlab), sendo o pH ajustado para 7,0. Após a esterilização do meio a 121°C por 15 minutos, este foi resfriado até 40°C e acrescentada a solução do açúcar específico para cada teste (manitol, sorbitol, melibiose e rafinose) numa concentração final de 1%. As soluções dos açúcares utilizadas (Inlab) foram previamente esterilizadas por filtração em membranas de éster de celulose com 0,22 µm (Millipore).

Para a realização das provas bioquímicas, alíquotas de 75 µL das culturas recentes (24 horas) crescidas em BHI foram inoculadas no meio sólido com o auxílio de um replicador de Steer, que torna possível a identificação de 25 amostras em cada uma das placas de Petri contendo o meio sólido de identificação. As placas foram incubadas e

as leituras dos resultados realizadas após 24 a 48 horas. O teste foi considerado positivo quando se observou viragem do indicador para amarelo, caracterizando a fermentação do açúcar com produção de ácidos (SHKLAIR & KEENE, 1974).

O teste de resistência à bacitracina foi realizado incorporando-se 2 U de bacitracina (Sigma) por mL do mesmo meio utilizado para o teste de fermentação de manitol (SHKLAIR & KEENE, 1974). O crescimento dos microrganismos nestas condições indica sua resistência ao antibiótico.

A prova de produção de peróxido de hidrogênio foi realizada em meio base composto de 0,5 g de extrato de carne (Difco), 0,5 g de extrato de levedura (Difco), 0,05 mL de Tween 80 (Synth), 0,01 g de sulfato de manganês (Difco), 1,5 g de ágar e água destilada q.s.p. 90 mL. Ao meio base (pH 7,2) autoclavado foram acrescentados 5 mL de uma suspensão de sangue desfibrinado de carneiro e água destilada em partes iguais, sendo o meio total aquecido a 100°C por 15 minutos. A este meio foram acrescentados 5 mL de uma solução de ortodianisidina (Sigma) a 2%, sendo o meio posteriormente vertido em placas de Petri. A semeadura foi realizada a partir das culturas recentes em BHI, consistindo de três inoculações próximas, realizadas com agulha de platina diretamente no meio de cultura. O teste foi considerado positivo quando houve mudança de cor para marrom escuro ou preto no local do crescimento bacteriano (WHITTENBURY, 1964).

A prova da hidrólise de arginina se baseia na produção ou não da enzima arginina-desaminase, a qual libera amônia ao reagir com o substrato arginina. A capacidade das cepas hidrolisarem arginina produzindo amônia, foi testada com a

semeadura de 0,1 mL do inóculo em tubos contendo o meio de cultura com o substrato. Após o período de incubação, foram adicionadas duas gotas do reativo de Nessler a cada tubo. A presença de amônia na cultura, evidenciada pelo aparecimento de coloração alaranjada, indica reação positiva enquanto que a coloração amarela indica prova negativa.

Através dos resultados obtidos pelas provas bioquímicas, os isolados foram identificados de acordo com a TAB. 2, baseada no manual de BERGEY (HARDIE, 1986).

TABELA 2: Identificação de estreptococos grupo mutans por provas bioquímicas

	<i>S. mutans</i>		<i>S. rattus</i>		<i>S. cricetus</i>		<i>S. sobrinus</i>		<i>S. ferus</i>	<i>S. macacae</i>	<i>S. downei</i>
grupos sorológicos	c-e-f	e	b		a		d-g		c	c	h
<u>Fermentação</u>											
Manitol	+	+	+		+		+		+	+	+
Sorbitol	+	+	+		+		+		+	+	+
Melibiose	+	-	+		+		-**		-	-	-
Rafinose	+	+	+		+		-**		-	+	-
<u>Produção de</u>											
H₂O₂	-	-	-		-		+		-	-	-
<u>Hidrólise da</u>											
Arginina	-	-	+		-		-		-	-	-
<u>Resistência à</u>											
Bacitracina	+	+	+		-		+		-	-	-

(*) algumas cepas podem dar resultado negativo; (**) algumas cepas podem dar resultado positivo.

4.5 - Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

Foram testadas três técnicas para extração do DNA bacteriano, utilizando-se a linhagem *S. mutans* (ATCC 25175) e dez amostras isoladas clinicamente. De acordo com a primeira técnica, os subcultivos oriundos de cada colônia foram inoculados em frascos contendo 3 mL de BHI e incubados a 37°C, pCO₂ 10%, por 24 horas. Os meios de cultura foram centrifugados e os sedimentos obtidos foram lavados duas vezes com tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), submetidos a um banho de fervura por 10 minutos e utilizados como template.

A segunda técnica de extração de DNA testada, foi proposta por SAARELA *et al.* (1996). As células foram também cultivadas em BHI, centrifugadas e ressuspensas em uma solução contendo 100 µL de tampão TE e 50 µL de dodecilssulfato de sódio (SDS) a 10%, sendo deixadas a 65°C por 30 minutos. As suspensões foram centrifugadas (6000 rpm/ 5 minutos) e os sobrenadantes descartados. Os tubos de eppendorf contendo os sedimentos foram aquecidos em forno de microondas por 2 minutos e 30 segundos. Os sedimentos foram dissolvidos em 250 µL de tampão TE e armazenados a -20°C.

A terceira técnica foi sugerida por OHO *et al.* (2000). As células bacterianas crescidas em BHI foram centrifugadas, ressuspensas e aquecidas em 200 µL de uma solução de lise (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 8.0) durante 10 minutos. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi usado como template nas reações de PCR.

Os resultados obtidos com as três técnicas de extração não apresentaram diferenças significativas, e em algumas das amostras testadas, bandas mais intensas e nítidas puderam ser observadas quando foi utilizado tampão TE, como descrito na primeira técnica, sendo esta técnica a escolhida para a obtenção do DNA das amostras deste estudo. O DNA das bactérias de cada uma das colônias foi então submetido a amplificação para a confirmação da sua identidade molecular na presença de um par de “iniciadores” espécie-específicos.

A técnica de PCR foi realizada utilizando-se iniciadores específicos para a porção do gene correspondente a glucosiltransferase (*gtfB* do *S. mutans* e *gtfI* do *S. sobrinus*). A sequência dos iniciadores utilizados neste estudo estão listados na TAB. 3.

TABELA 3: Sequência dos iniciadores utilizados na técnica de PCR

Iniciadores	Sequência	Localização (pb)
GTFB-F	5'-ACTACACTTTTCGGGTGGCTTGG	793-814
GTFB-R	5'-CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC	1288-1309
GTFI-F	5'-GATAACTACCTGACAGCTGACT	871-892
GTFI-R	5'-AAGCTGCCTTAAGGTAATCACT	1561-1582
GTFB-FIN	5'-AAAGCAGATTCTAATGAATCGA	817-838
GTFB-RIN	5'-AATGTAAAATTTTGCCATCAGC	1264-1285
GTFI-FIN	5'-TGGTATCGTCCAAAATCAATCC	895-916
GTFI-RIN	5'-AGATTTGCAGTTGGTCAGCATC	1537-1558

A primeira PCR, incluiu os iniciadores GTFB-F e GTFB-R (Gibco), desenhados para amplificar o fragmento de DNA de 517 pb da sequência *gtfB* do *S. mutans* (SHIROZA *et al.*, 1987), e os iniciadores GTFI-F e GTFI-R (Gibco), desenhados para amplificar o fragmento de 712 pb da sequência *gtfI* do *S. sobrinus* (ABO *et al.*, 1991).

Cada mistura de PCR (50 μ L) consistiu de 3,0 mM $MgCl_2$, 5,0 μ L do tampão de reação 10 X concentrado (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), 0,2 mM de uma solução contendo dATP, dTTP, dGTP e dCTP, 0,5 μ M de cada um dos dois iniciadores usados em cada reação (GTFB-F/ GTFB-R e GTFI-F/ GTFI-R), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Life) e 10 μ L de solução template. As reações foram conduzidas através da desnaturação inicial das fitas de DNA a 95°C por 5 minutos, seguido de ciclos subsequentes com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 59°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto. Após 30 ciclos, uma etapa final de 72°C por 7 minutos determinou o final da amplificação.

Procurando melhorar a capacidade de identificação das espécies, os iniciadores GTFB-FIN e GTFB-RIN, baseados na sequência interna amplificada pelos iniciadores GTFB do *S. mutans*, como produto da primeira PCR, foram também utilizados. Assim como, os iniciadores GTFI-FIN e GTFI-RIN foram desenhados com base na sequência interna amplificada pelos iniciadores GTFI do *S. sobrinus* (OHO *et al.*, 2000). Os produtos (10 μ L) obtidos a partir da amplificação da primeira PCR usando os iniciadores GTFB-F/ GTFB-R e GTFI-F/ GTFI-R, foram usados como template para a segunda PCR, conduzida sob as mesmas condições da primeira.

Os produtos de ambas as reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (Gibco BRL- Life Technology) em tampão tris-borato-EDTA (TBE). Foi incluído em cada gel um padrão de peso molecular de 100 pb (DNA ladder, Gibco BRL- Life Technology). Após o término de cada corrida, o gel foi corado com brometo de

etídio 0,5 µg/mL. Depois de corados os géis foram analisados visualmente sobre transiluminador de luz ultravioleta. A ocorrência de uma única banda de 517 pb para a primeira PCR e 468 pb para segunda PCR, confirmou a identidade molecular do *S. mutans*. E uma única banda de 712 pb para a primeira PCR e 663 pb para a segunda PCR, confirmou a identidade do *S. sobrinus*.

4.6 - Reação em Cadeia da Polimerase com Iniciadores Arbitrários – AP- PCR

As linhagens confirmadas pela técnica de PCR como sendo *S. mutans* e sua linhagem ATCC 25175, foram inoculadas em frascos com 3 mL de BHI, e incubados a 37°C, pCO₂ 10% por 24 horas. Para obtenção do DNA destas amostras, foi realizado o protocolo descrito anteriormente para realização da PCR, utilizando-se tampão TE.

Os iniciadores selecionados neste estudo para a realização da técnica de AP-PCR, OPA-02 (Gibco - TGCCGAGCTG) e OPA-13 (Gibco - CAGCACCCAC), foram capazes de gerar de 5 a 9 amplicons discerníveis e reproduzíveis do DNA do *S. mutans*. A seleção destes iniciadores foi baseada na qualidade e número de amplicons produzidos por uma sequência específica. Para determinar as condições ótimas das reações, foram testadas diferentes concentrações do iniciador (0,25 µM a 1,0 µM), MgCl₂ (1,0 mM a 10,0 mM), solução contendo dATP, dTTP, dGTP e dCTP (0,1mM a 0,4 mM) e template (10 a 100 ng), assim como foram variadas as temperaturas de anelamento.

As condições finais julgadas melhores para o AP-PCR consistiu de 45 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 36°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, sem etapas transitórias entre cada temperatura. Cinquenta

nanogramas de DNA template, 1,0 μ M do iniciador, 5 μ L do tampão de reação 10 X concentrado (100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl), 7 mM $MgCl_2$, 0,2 mM da solução contendo dATP, dTTP, dGTP e dCTP, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase em volume final de reação de 50 μ L, produziram os melhores padrões suficientemente distinguíveis.

Os produtos da AP-PCR foram analisados por eletroforese em um gel de agarose 1%, em tampão TBE. Sendo incluído em cada gel um padrão de peso molecular de 1kb (DNA ladder, Gibco BRL- Life Technology). Após o término de cada corrida, o gel foi corado com brometo de etídio 0,5 μ g/mL.

4.7 - Análise dos Padrões Eletroforéticos

Os géis obtidos como resultado da aplicação da técnica de AP-PCR foram fotografados pelo equipamento Image Master – VDS (Pharmacia Biotech) e capturados pelo programa computacional LISCAP. Suas imagens positivas e a demarcação das bandas eletroforéticas foram processadas através do programa Sigma Gel (Jandel Co.), que forneceu a mobilidade relativa de cada banda (valores de R_f) em função dos valores conhecidos dos padrões de massa molecular.

4.8 - Construção das Matrizes e Dendrogramas de Similaridade

As bandas eletroforéticas, representadas pelos valores de R_f tiveram suas distâncias de migração convertidas em valores numéricos que receberam representações 1 (um) para presença e 0 (zero) para ausência das bandas, numa comparação entre os “lanes”. O conjunto dessas informações gerou uma matriz de dados binários que foi

plotada no sistema NTSYS versão 1.70 (Applied Biostatistics), empregando-se o programa QUALITATIVE e o coeficiente de similaridade SM (Simple Matching Coefficient).

Utilizando o mesmo pacote estatístico, essas matrizes de similaridade foram transferidas para o programa SHAN CLUSTERING, onde através do método de agrupamento UPGMA (unweighted pair-group method with mathematic average), foram gerados dendrogramas que possibilitaram as avaliações dos graus de similaridade existentes e o agrupamento dos possíveis clones formados entre as amostras de *S. mutans*.

4.9 - Análises Estatísticas

A composição da microbiota presente na cavidade bucal dos indivíduos e identificada pelas provas bioquímicas e técnica de PCR foi comparada pelos testes estatísticos não paramétricos: Kruskal-Wallis, Wilcoxon-Mann-Whitney e Friedman. Os testes, Kruskal-Wallis e Friedman, foram utilizados também para verificar diferenças entre os sítios apenas para os microrganismos *S. mutans* e *S. sobrinus*.

5. RESULTADOS

5.1- Isolamento Bacteriano

Após o cultivo em MSB das amostras coletadas neste estudo, foram selecionadas todas as colônias com morfologia típica de estreptococos grupo mutans, assim como algumas colônias de morfologia atípica.

Um total de 728 colônias foram isoladas, sendo que cerca de 5% (37 colônias) da microbiota total cultivada não puderam ser classificadas devido a perda da viabilidade durante as investigações e 691 colônias foram destinadas aos procedimentos de identificação. Dentre as 691 amostras trabalhadas, 353 isoladas da cavidade bucal de cinco voluntários foram identificadas por provas bioquímicas e PCR. O número de colônias isoladas em cada sítio dos voluntários é apresentado na TAB.

4.

TABELA 4: Número de colônias isoladas em MSB e provenientes de diferentes nichos da cavidade bucal dos voluntários

Voluntários	S	PC	PLC	TC	PR	PLR	TR	TOTAL
1	10	0	10	14	0	8	11	53
2	10	15	10	15	10	3	15	78
3	15	15	10	15	5	10	15	85
4	16	12	10	15	5	8	20	86
5	15	0	12	11	0	3	10	51
6	10	11	8	16	13	5	15	78
7	13	11	13	17	16	11	18	99
8	7	15	16	16	16	13	20	103
9	10	10	15	15	15	15	15	95
Total	106	89	104	134	80	76	139	728
Média	11.8	9.9	11.5	14.9	8.9	8.4	15.4	80.9

S = saliva; PC = placa dental superficial a coroa hígida; PLC = placa dental superficial a lesão de cárie coronária; TC = tecido cariado da lesão coronária; PR = placa dental superficial a raiz hígida; PLR = placa dental superficial a lesão radicular e TR = tecido cariado da lesão radicular.

5.2 - Provas Bioquímicas

A TAB. 5 e o GRAF. 1 apresentam os resultados obtidos nos testes de identificação bioquímica dos estreptococos grupo mutans isolados a partir das amostras de saliva, placa dental e tecido cariado presentes na cavidade bucal de cinco voluntários, e que permitiram a classificação destes microrganismos em quatro espécies: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. ferus* e *S. cricetus*.

Dentre os 353 microrganismos isolados dos diferentes nichos pesquisados, obtivemos 46 (13%) isolados de sítios variados que não se encaixaram no perfil bioquímico proposto por SHKLAIR & KEENE (1974), sendo classificados como *Streptococcus* sp. A maior parte dos isolados foi identificada como sendo a espécie *S. mutans* (59,2 %), seguido de *S. sobrinus* (15,3%), *S. ferus* (6,5%) e *S. cricetus* (5,9%).

TABELA 5: Número de espécies de estreptococos grupo mutans isoladas de diferentes nichos da cavidade bucal de 5 voluntários e identificadas por provas bioquímicas

Espécies	Nichos da cavidade bucal								
	S	PC	PR	PLC	PLR	TC	TR	TOTAL	
<i>S. mutans</i>	46	24	5	37	17	37	43	209 (a)	59,2
<i>S. sobrinus</i>	7	2	4	1	7	15	18	54 (b)	15,3
<i>S. ferus</i>	3	6	0	7	1	2	4	23 (b)	6,5
<i>S. cricetus</i>	0	3	0	5	2	7	4	21 (b)	5,9
<i>Streptococcus</i> sp.	10	7	11	2	5	9	2	46	13,0
Total	66	42	20	52	32	70	71	353	100

* Números seguidos de letras desiguais são estatisticamente diferentes.

Através da análise estatística realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, verifica-se que existem diferenças entre o número de espécies identificadas, ao nível

de significância de 5% ($p = 0,000756$ ou $0,0756\%$, $p < 5\%$). As comparações múltiplas entre os microrganismos nos mostra que o número de *S. mutans* difere de todas as demais espécies, porém entre estas não há diferenças significativas. A espécie *S. mutans* foi prevalente em todos os voluntários, sendo que em apenas um dos indivíduos não houve diferenças entre a proporção de *S. mutans* e *S. sobrinus* ($p = 22\%$, $p > 5\%$).

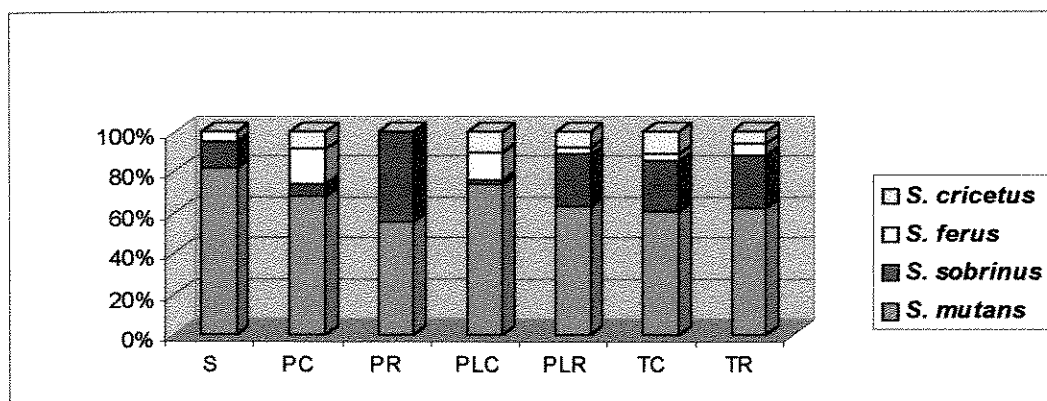
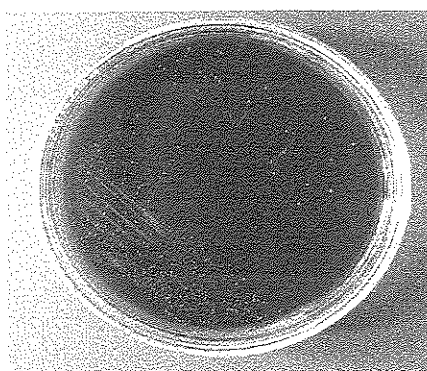
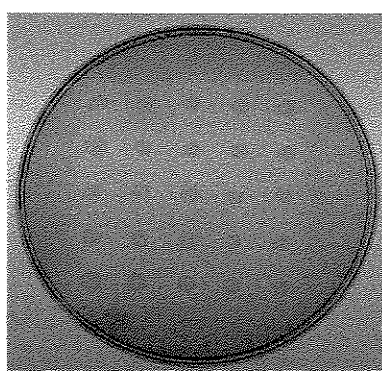


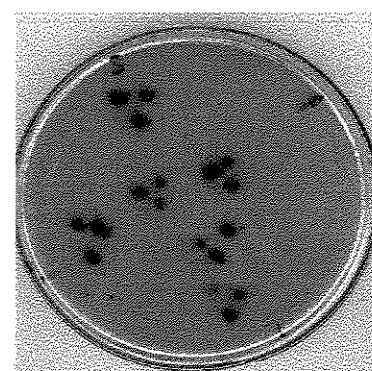
GRÁFICO 1: Distribuição e frequência de estreptococos grupo mutans isolados de diferentes nichos da cavidade bucal.



A



B



C

FIGURA 1: Cultivo e identificação bioquímica das espécies de estreptococos grupo mutans; A: cultivo em MSB; B: fermentação de açúcares; C: produção de peróxido de hidrogênio.

Para verificar diferenças entre os sítios pesquisados de cada voluntário, foi utilizado o teste Wilcoxon-Mann-Whitney. Como o número total de microrganismos em cada sítio depende do tamanho da amostra, que é desigual nos diversos sítios, optou-se por trabalhar com os dados referentes à proporção do microrganismo de interesse em relação ao número total de microrganismos encontrados. Os resultados demonstraram que existem diferenças significativas entre os sítios, no que se refere à quantidade de *S. mutans* ($p = 1,1\%$). Quanto a espécie *S. sobrinus* não foram encontradas diferenças significativas entre os sítios ($p = 7,83\%$).

Streptococcus sobrinus foram caracterizados por possuir pouca capacidade de fermentação dos carboidratos testados. Além disso, apenas 51% das espécies *S. sobrinus* fermentaram manitol nas primeiras 24 horas do período de incubação, sendo que ao final do período adicional de 24 horas, todas as espécies *S. sobrinus* foram capazes de fermentar este açúcar.

De acordo com HARDIE (1986), os *Streptococcus mutans* podem ser diferenciados baseados na sua capacidade ou não de fermentar a melibiose. Neste estudo pudemos observar que boa parte das espécies *S. mutans* não apresentavam a capacidade de fermentar melibiose e/ou rafinose, desta forma as cepas foram divididas em biótipos baseados nestas características fenotípicas (TAB. 6).

TABELA 6: Classificação de biótipos de *S. mutans* baseada na capacidade de fermentar melibiose e/ou rafinose

Espécies <i>S. mutans</i>	Rafinose positivo	Rafinose negativo	Total
Melibiose positivo	132	17	149
Melibiose negativo	28	32	60
Total	160	49	209

5.3 - PCR

Dentre os 691 isolados da cavidade bucal de nove voluntários, 438 (63,38%) foram identificados pela técnica de PCR como sendo *S. mutans*, 160 (23,15%) como *S. sobrinus* e 93 (13,45%) não foram identificados por esta técnica. As espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* provenientes da saliva, placa dental e tecido cariado puderam ser encontrados em 9 e 8 voluntários, respectivamente, sendo variável a frequência e distribuição destas espécies. A FIG. 2 apresenta a amplificação do gene da glucosiltransferase de *S. mutans* e *S. sobrinus* pela técnica de PCR.

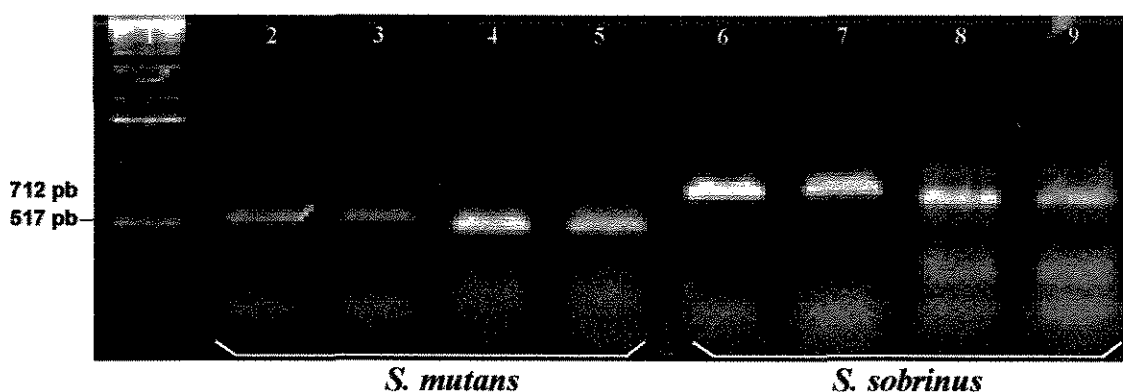


FIGURA 2: Amplificação do gene da glucosiltransferase de *S. mutans* e *S. sobrinus* pela técnica de PCR, utilizando-se os primers GTFB e GTFI, respectivamente; 1: padrão de peso molecular de 1 Kb; 2 e 3: fragmentos de DNA de 517 pb da sequência *gtfB* do *S. mutans*, obtidos pela primeira PCR (*S. mutans* ATCC 25175 e isolado clínico); 4 e 5: fragmentos de 468 pb obtidos pela segunda PCR; 6 e 7: fragmentos de 712 pb da sequência *gtfI* do *S. sobrinus*, obtidos pela primeira PCR (*S. sobrinus* Ib 6715 e isolado clínico); 8 e 9: fragmentos de 663 pb obtidos pela segunda PCR.

A TAB. 7 apresenta os resultados das identificações das espécies *S. mutans* e *S. sobrinus*, obtidos pela primeira e segunda PCR, utilizando-se os primers específicos para cada uma destas espécies.

TABELA 7: Identificação das espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* pelas reações de PCR

Espécies	1º PCR	2º PCR	TOTAL
<i>S. mutans</i>	331 (75,6%)	107 (24,4%)	438
<i>S. sobrinus</i>	95 (59,4%)	65 (40,6%)	160
TOTAL	426	172	598

As mesmas análises para a distribuição e frequência de *S. mutans* e *S. sobrinus* aplicados com os resultados obtidos pelas provas bioquímicas, foram também realizadas com os resultados obtidos pela técnica de PCR, sendo que neste caso foram incluídos todos os voluntários. Os dados apresentados na TAB. 8, demonstraram que existem diferenças entre os sítios pesquisados quanto a espécie *S. mutans* ($p = 0,93\%$).

TABELA 8: Número de cepas de *S. mutans* isoladas de diferentes nichos da cavidade bucal de 9 voluntários e identificadas por PCR

Voluntários	S	PC	PLC	TC	PR	PLR	TR	Total
1	4	0	5	10	0	1	8	28
2	4	6	6	10	3	2	11	42
3	14	14	6	11	0	4	5	54
4	3	3	7	6	0	8	15	42
5	15	0	8	10	0	1	11	45
6	8	7	6	16	8	0	15	60
7	5	6	9	9	3	2	3	37
8	7	12	16	12	14	11	19	91
9	10	3	12	11	0	2	1	39
Total	70	51	75	95	28	31	88	438
Média	7,78	7,29	8,33	10,56	5,60	3,44	9,78	48,7

Os sítios foram comparados, considerando-se separadamente as espécies *S. mutans* e *S. sobrinus*. Com relação a espécie *S. mutans* (TAB. 9), as comparações múltiplas mostram diferenças significativas entre os sítios TC e PC, TC e PLR, TC e PR, TR e PLR, TR e PR, PLC e PLR, PLC e PR, e entre S e PR.

TABELA 9: Comparações entre os sítios pesquisados, dois a dois, em relação a espécie *S. mutans*

Sítios	Médias*
TC	46,33 a
TR	41,17 a b
PLC	37,94 a b
S	35,33 a b c
PC	27,33 b c d
PLR	19,17 c d
PR	16,83 d

* médias obtidas a partir da aplicação do teste de Friedman

Além das comparações entre sítios, dois a dois, foram verificados ainda os possíveis contrastes entre grupos de sítios e significância dos mesmos (TAB. 10). Observando-se o contraste 5, é possível constatar que existe uma diferença significativa quando se compara superfície coronária sadia (PC) e superfície coronária com cárie (PLC+TC). Com relação a superfície radicular, esta mesma diferença não pode ser verificada (contraste 6).

TABELA 10: Contrastes obtidos pelas comparações entre os sítios de interesse com relação a espécie *S. mutans*

Contraste 1: (TC + TR) vs (PLC + PLR + PC + PR)	(sign., p = 0,00035)
Contraste 2: (PC + PR) vs (PLC + TC + PLR + TR)	(sign., p = 0,00703)
Contraste 3: (PLC + TC) vs (PLR + TR)	(sign., p = 0,04874)
Contraste 4: (PLC + PC) vs (PLR + PR)	(sign., p = 0,01530)
Contraste 5: PC vs (PLC + TC)	(sign., p = 0,04655)
Contraste 6: PR vs (PLR + TR)	(não sign., p = 0,07380)

A TAB. 11 apresenta os resultados obtidos pela identificação de *S. sobrinus* isolados de nove voluntários através da técnica de PCR. Assim como os resultados das provas bioquímicas, verificou-se que não existem diferenças significativas entre os sítios no que se refere à presença de *S. sobrinus* ($p = 16,7\%$). Observa-se que o paciente 5 foi eliminado da análise, pois não foi isolada nenhuma espécie *S. sobrinus* em qualquer dos sítios.

TABELA 11: Número de espécies *S. sobrinus* isoladas de diferentes nichos da cavidade bucal de 9 voluntários e identificadas por PCR

Voluntários	S	PC	PLC	TC	PR	PLR	TR	Total
1	5	0	0	2	0	5	1	13
2	0	0	1	3	4	0	1	9
3	1	0	0	1	0	0	4	6
4	0	2	0	2	0	0	1	5
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	4	2	0	5	5	0	16
7	8	5	4	8	13	9	15	62
8	0	0	0	0	2	2	0	4
9	0	0	3	2	15	12	13	45
TOTAL	14	11	10	18	39	33	35	160
MÉDIA	1.55	1.22	1.11	9.00	4.33	3.66	3.88	17.8

5.4 - Comparações: Provas bioquímicas e PCR

Com o objetivo de verificar a eficácia dos métodos de identificação bacteriana utilizados neste estudo, foram comparados os resultados obtidos pelas provas bioquímicas e PCR, e que permitiram a identificação das espécies *S. mutans* e

S. sobrinus provenientes das mesmas amostras de cinco voluntários. Para tanto foram aplicados os testes de Wilcoxon-Mann-Withney e o teste de Friedman, como pode ser visto nas TAB. 12 e 13.

TABELA 12: Comparação entre os resultados das identificações da espécie *S. mutans* através de provas bioquímicas e PCR

Métodos	S	PC	PLC	TC	PR	PLR	TR	TOTAL
Bioquímicas:	46	24	37	37	5	16	43	208
Postos: Mann-Withney	12	6	8,5	8,5	2	3,5	11	
Postos: Friedman	2	2	2	1	2	1,5	1	
PCR:	40	23	32	47	3	16	50	211
Postos: Mann-Withney	10	5	7	13	1	3,5	14	
Postos: Friedman	1	1	1	2	1	1,5	2	

Os valores obtidos pelos testes estatísticos: Wilcoxon-Mann-Withney e Friedman deram origem a diferentes postos.

Utilizando o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, não foram detectadas diferenças significativas entre a média do número de *S. mutans* encontrados nos dois testes de identificação ($p = 92,7\%$). Observa-se ainda que a aplicação do teste de Friedman para dois tratamentos, não faz com que as conclusões se alterem ($p = 68,8\%$).

TABELA 13: Comparação entre os resultados das identificações da espécie *S. sobrinus* através de provas bioquímicas e PCR

Métodos	S	PC	PLC	TC	PR	PLR	TR	TOTAL
Bioquímicas:	6	2	1	6	4	5	7	31
Postos: Mann-Withney	8,5	3,5	1,5	8,5	5,5	7	11	
Postos: Friedman	1	1,5	1,5	1	1,5	1	1	
PCR:	7	2	1	15	4	7	18	54
Postos: Mann-Withney	11	3,5	1,5	13	5,5	11	14	
Postos: Friedman	2	1,5	1,5	2	1,5	2	2	

O mesmo ocorre em relação a espécie *S. sobrinus*, ou seja, não existem diferenças significativas entre o número médio de microrganismos encontrados através das provas bioquímicas e PCR. As conclusões obtidas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Withney ($p = 39,8\%$) são confirmadas pelo teste de Friedman ($p = 12,5\%$). Embora os resultados tenham demonstrado um maior número de microrganismos detectados pela técnica de PCR, tais diferenças não são evidenciadas nos testes estatísticos utilizados.

5.5 - AP- PCR

A técnica de AP-PCR foi utilizada para analisar a variabilidade genética existente entre 438 cepas de *S. mutans* identificadas pela técnica de PCR. A amplificação do DNA genômico destas espécies pelo primer OPA-02 gerou produtos de AP-PCR variando entre 2.1 a 0,4 kb, sendo evidente em grande parte dos isolados a amplificação de uma forte banda de 0,8 kb. O primer OPA-13 gerou produtos de 1,6 a 0,6 kb (FIG. 3 a 6).

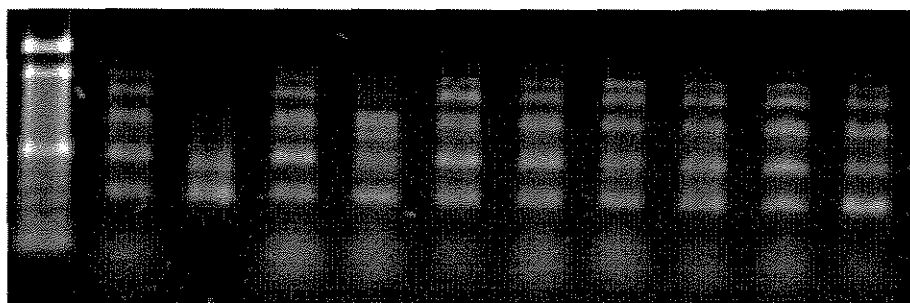


FIGURA 3: Padrões eletroforéticos de *S. mutans* isolados de sítios da cavidade bucal de um mesmo paciente, obtidos pela técnica de AP-PCR (primer OPA-02). 1: padrão de peso molecular de 100 pb; 2-4: saliva; 5-7: placa superficial a raiz hígida; 8-9: placa superficial a lesão radicular; 10-11: lesão radicular.

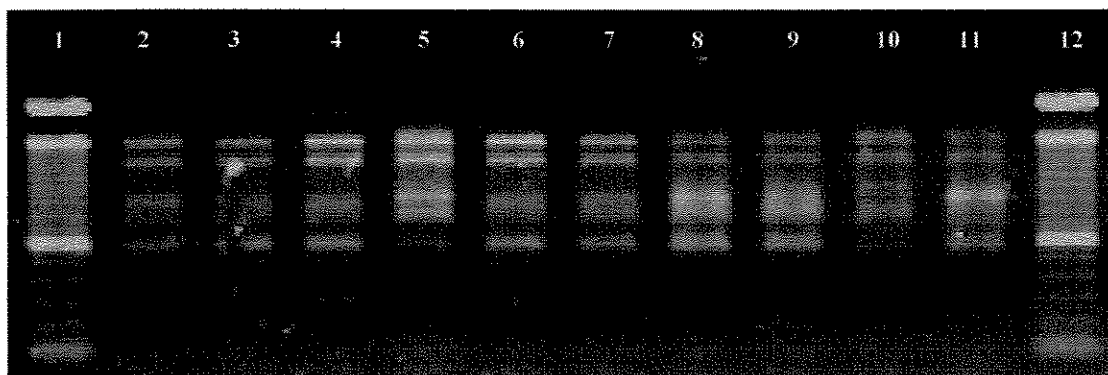


FIGURA 4: Padrões eletroforéticos similares de *S. mutans* isolados da cavidade bucal de um mesmo voluntário (primer OPA-02); 1 e 12: padrão de peso molecular de 100 pb; 2-4: *S. mutans* isolados da saliva; 5-7: *S. mutans* isolados da placa dental superficial a lesão radicular; *S. mutans* isolados do tecido cariado presente na lesão radicular.

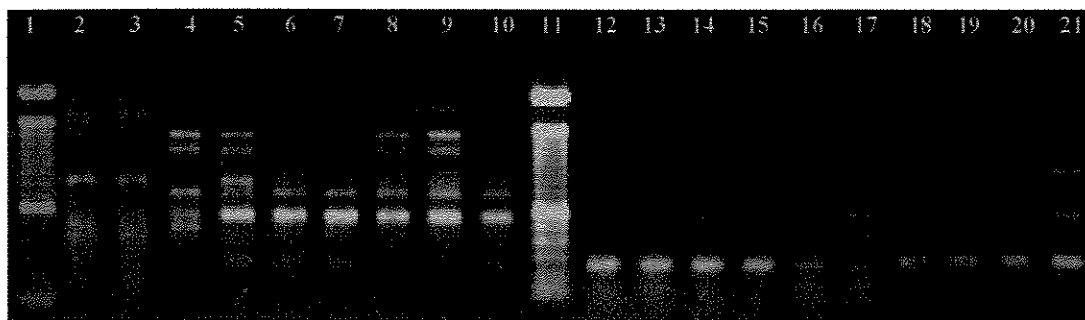


FIGURA 5: Padrões eletroforéticos de *S. mutans* isolados das cavidades bucais de dois pacientes (primer OPA-02). 1 e 11: padrão de peso molecular de 100 pb; 2-10: *S. mutans* isolados de diferentes sítios da cavidade bucal do voluntário 01; 12-21: *S. mutans* isolados de diferentes sítios do paciente 03. Foi possível observar em um mesmo sítio de um mesmo voluntário, padrões diferenciados de *S. mutans* capazes (9) e não capazes (10) de fermentar determinados açúcares como a melibiose.

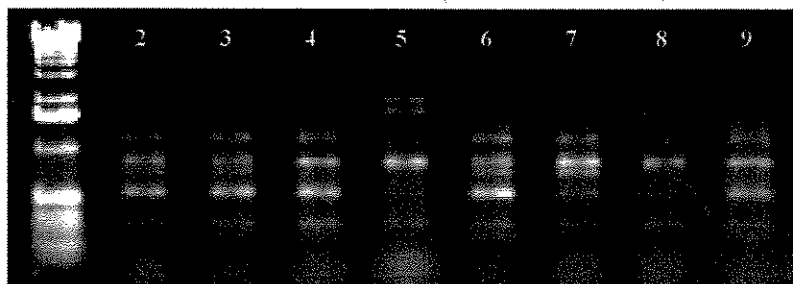


FIGURA 6: Padrões eletroforéticos de *S. mutans* isolados da cavidade bucal de um mesmo paciente (primer OPA-13). 1: padrão de peso molecular de 1 Kb; 2-4: saliva; 5-7: placa superficial a lesão radicular; 8-9: lesão radicular.

Os sítios pesquisados mostraram-se colonizados por 1 a 5 padrões de AP-PCR diferentes, como pode ser observado na TAB. 14, deve-se salientar que um mesmo padrão pode ser encontrado em mais de um sítio de um voluntário.

TABELA 14: Números de padrões de AP-PCR de *S. mutans* encontrados em cada sítio pesquisado dos voluntários

Voluntários	S	PC	PLC	TC	PR	PLR	TR
1	1	0	1	1	0	1	2
2	2	1	1	2	2	1	1
3	2	2	1	2	0	3	1
4	2	1	2	1	0	2	2
5	2	0	3	2	0	1	5
6	3	2	2	2	2	0	2
7	1	2	2	3	1	1	2
8	2	1	2	2	2	2	2
9	1	1	2	1	0	1	1

A TAB.15 apresenta o total do número de perfis genéticos encontrados em todos os sítios da cavidade bucal dos indivíduos. Comparando-se os voluntários 5 e 8, é possível observar que um número maior de espécies analisadas não implica na obtenção de um maior número de perfis genéticos.

TABELA 15: Número de perfis genéticos de *S. mutans* encontrados e número de cepas analisadas pela técnica de AP-PCR

Voluntários	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nº de perfis	3	5	7	2	10	3	4	4	2
Nº de cepas	28	42	54	42	45	60	37	91	39

Os dendrogramas representativos do agrupamento de perfis genéticos de *S. mutans* encontrados em cada voluntário são apresentados pelas FIG. 7 a 16. A FIG. 7 apresenta a ocorrência simultânea de três perfis genéticos de *S. mutans* na cavidade bucal do voluntário 1. O clone predominante mostrou-se disperso em diferentes sítios: saliva, lesões cariosas e placa sobreposta à lesão coronária. Dois outros clones menores mostraram uma tendência de colonização sítio-específica para lesão radicular e placa sobreposta à esta mesma lesão, respectivamente.

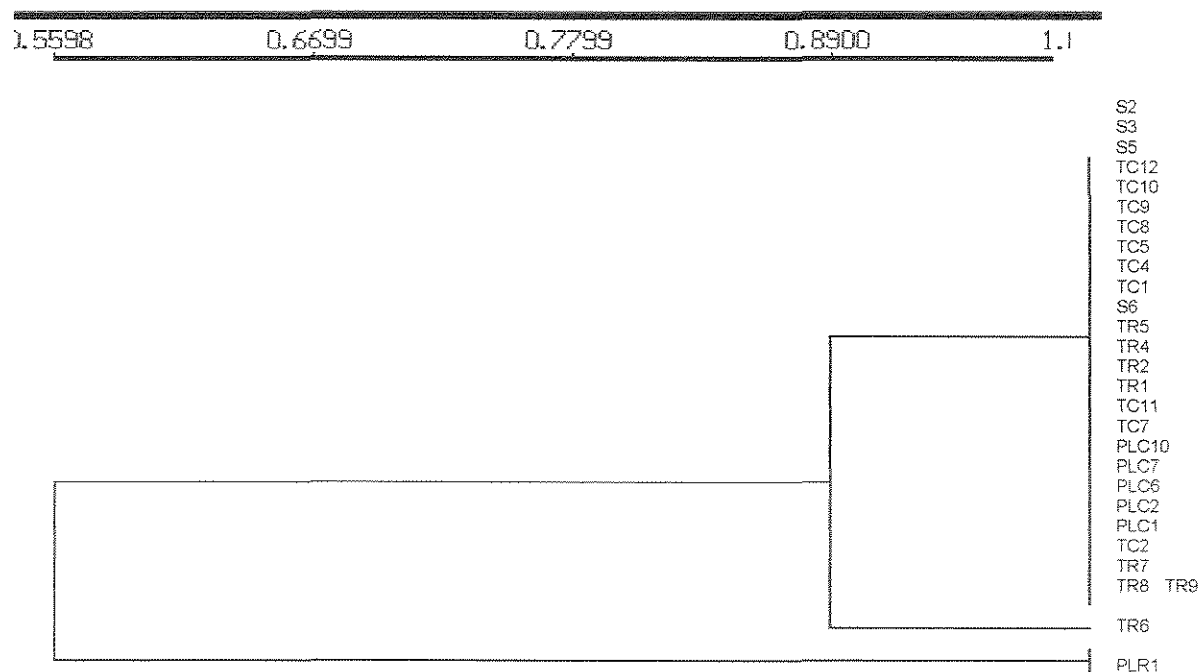


FIGURA 7: Dendrograma representativo do agrupamento de perfis genéticos idênticos de *S. mutans* determinados pela AP-PCR, e ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário 1.

Na FIG. 8 é possível observar a ocorrência simultânea de cinco diferentes clones de *S. mutans* colonizando a cavidade bucal do voluntário 2. O clone predominante mostrou-se disperso em diferentes sítios: saliva, placa sobreposta a coroa hígida, lesões de cárie e placa sobreposta a lesão coronária. Outros clones menores mostraram-se dispersos, e apenas um destes não apresentou uma tendência de colonização sítio-específica, sendo encontrado tanto na saliva quanto na placa sobreposta a superfície radicular sadia. Uma única cepa proveniente do tecido da lesão coronária (TC1) apresenta alta similaridade ($S_{SM} = 0,8870$) com os isolados do clone de maior incidência.

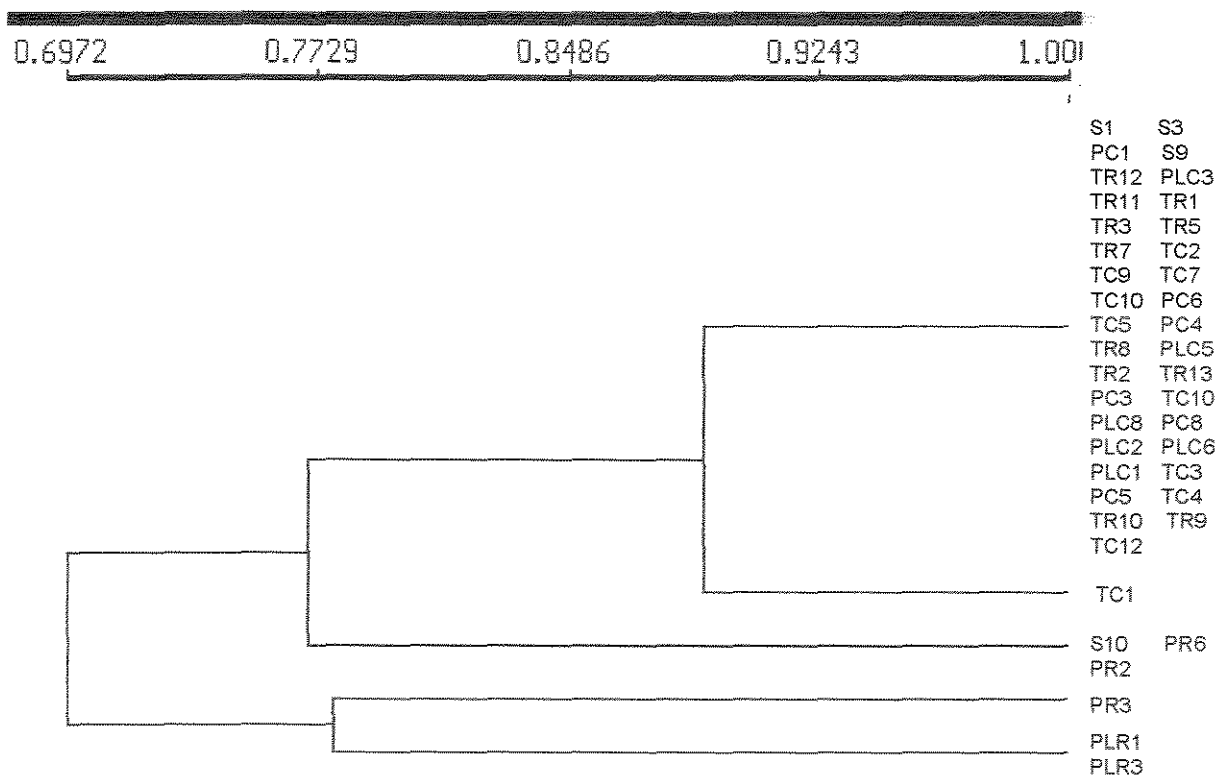


FIGURA 8: Dendrograma representativo do agrupamento de perfis genéticos idênticos de *S. mutans* determinados pela AP-PCR, e ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário 2.

O voluntário 3 apresentou colonização por sete diferentes clones, como pode ser observado na FIG. 9. O clone predominante mostrou-se coexistente em saliva, placas dentais sobrepostas as lesões coronária e radicular e placa superficial a coroa hígida. Dois outros clones em especial colonizaram seletivamente lesão coronária e lesão radicular, respectivamente. E ainda, quatro clones menores foram representados por apenas um isolado bacteriano.

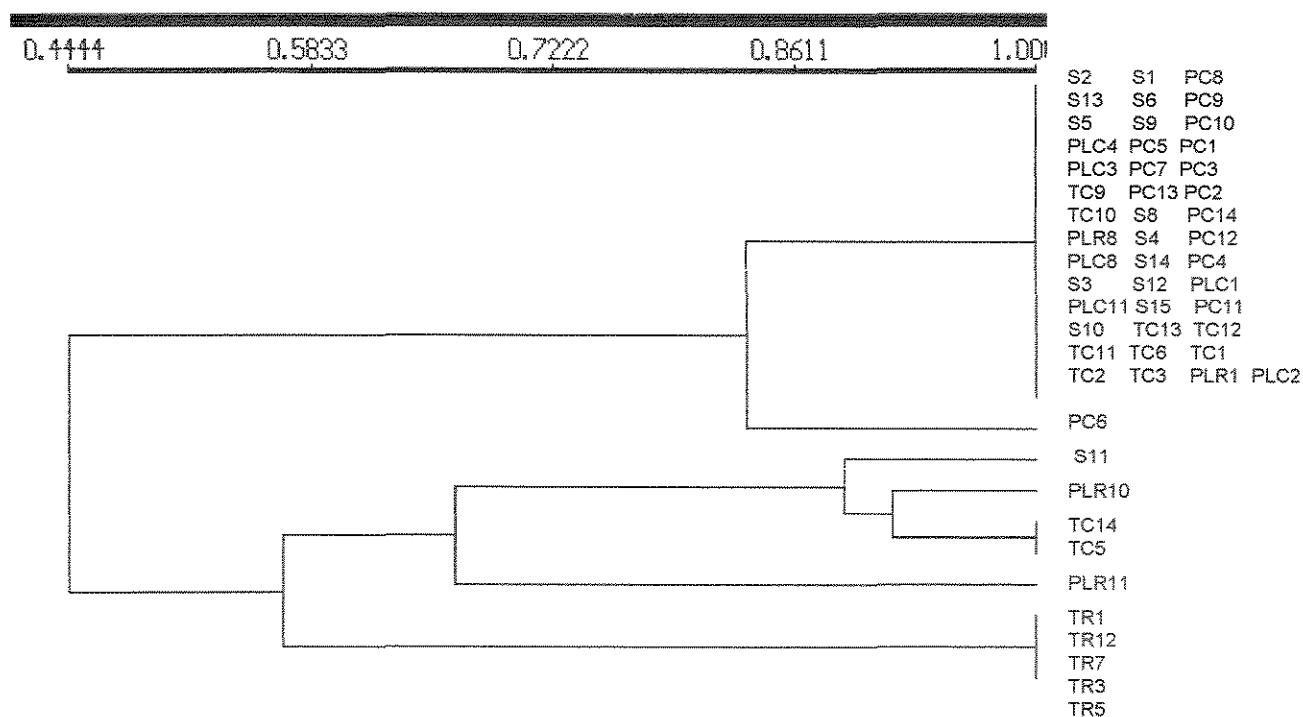


FIGURA 9: Dendrograma representativo do agrupamento de perfis genéticos idênticos de *S. mutans* determinados pela AP-PCR, e ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário 3.

O dendrograma do voluntário 4 representado na FIG. 10 apresenta a formação de dois agrupamentos (*clusters*) de isolados com similaridade máxima ($S_{SM} = 1,0000$). Um dos perfis genéticos foi encontrado na saliva, placa superficial a lesão coronária, placa superficial a lesão radicular e lesões coronária e radicular, sendo que o segundo perfil colonizava todos os sítios de coleta exceto lesão coronária.

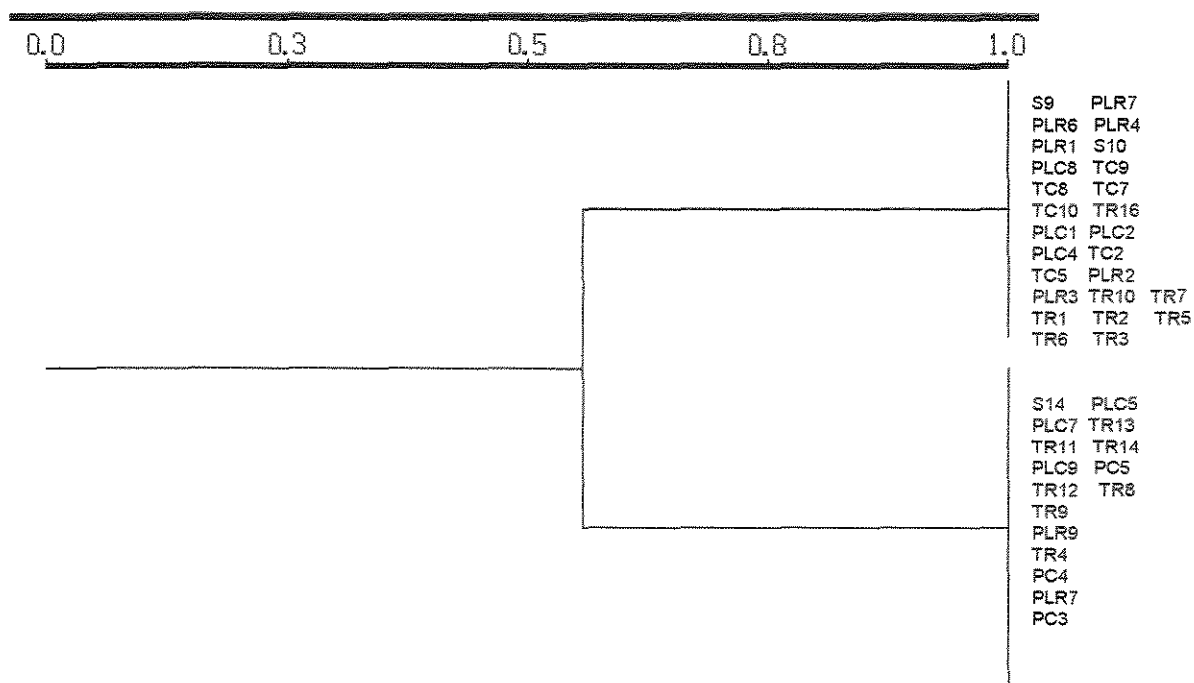


FIGURA 10: Dendrograma representativo do agrupamento de perfis genéticos idênticos de *S. mutans* determinados pela AP-CR, e ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário 4 .

O extenso polimorfismo detectado nos isolados de *S. mutans* da cavidade bucal do paciente 5 (FIG. 11) levou a construção de uma árvore de similaridade com dez variantes genéticas da bactéria. A despeito desse relativo número de clones, nenhum deles apresenta-se como predominante. A lesão radicular foi sítio de colonização para cinco clones, sendo que três destes não foram encontrados em nenhum outro nicho, caracterizando uma colonização sítio-específica destes padrões genéticos. A placa dental sobreposta a lesão coronária albergava dois clones que colonizavam unicamente este sítio. Cabe ressaltar ainda que três outros clones também apresentaram este perfil de colonização, estando presentes apenas na lesão coronária, placa dental sobreposta a lesão radicular e saliva, respectivamente.

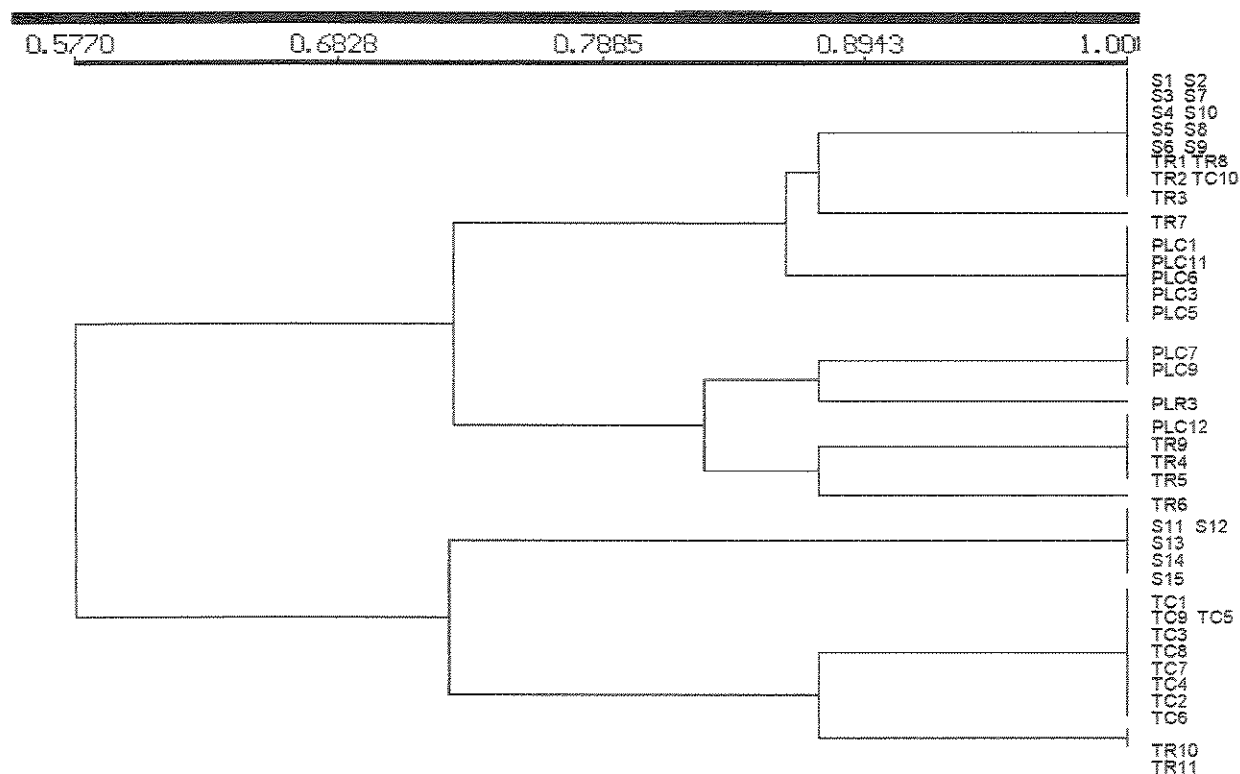


FIGURA 11: Dendrograma representativo do agrupamento de perfis genéticos idênticos de *S. mutans* determinados pela AP-PCR, e ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário 5.

Os três tipos genéticos de *S. mutans* detectados na cavidade bucal do voluntário 6 apresentaram uma frequência de distribuição quase igualitária (FIG.12). Um clone apresentou baixa similaridade com os demais ($S_{SM} = 0,4330$). No momento da amostragem, a saliva encontrava-se colonizada pelos três clones, e estes mostraram-se dispersos entre os sítios de coleta.

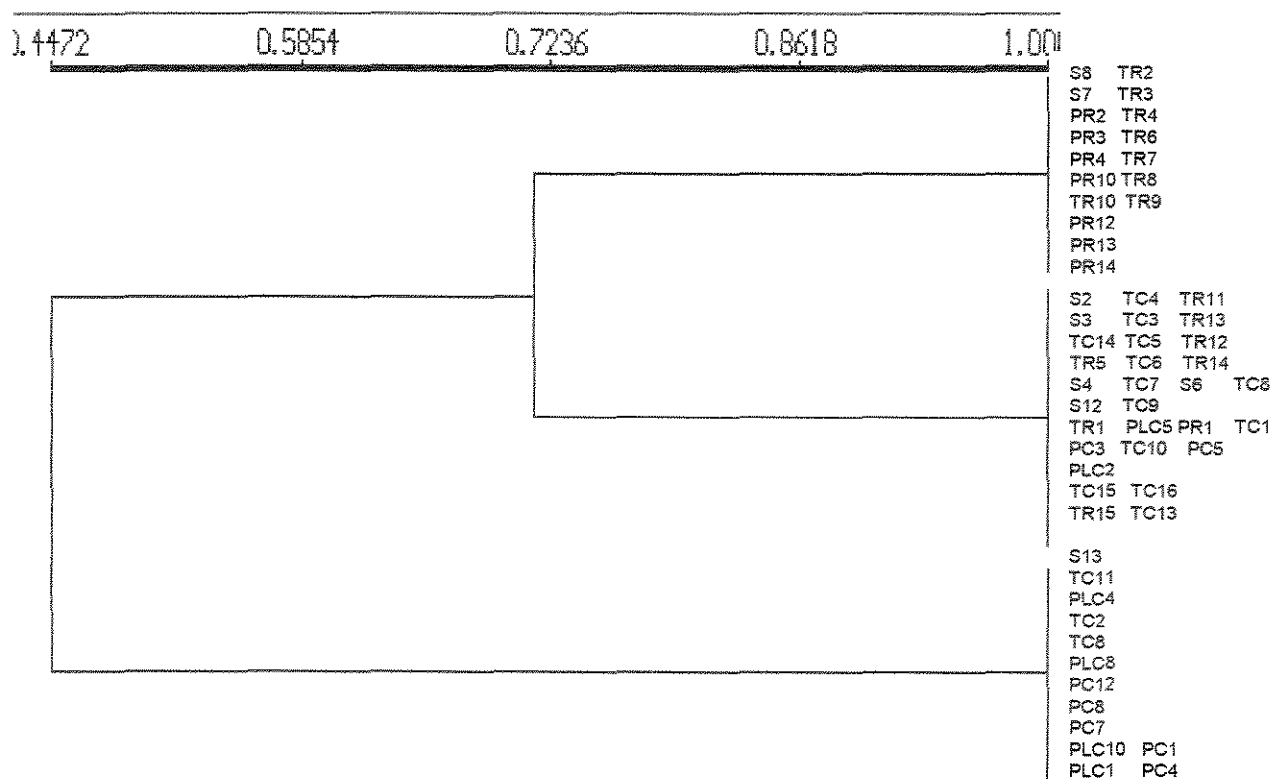


FIGURA 12: Dendrograma representativo do agrupamento de perfis genéticos idênticos de *S. mutans* determinados pela AP-PCR, e ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário 6.

O voluntário 7 apresentou colonização por quatro tipos genéticos (FIG. 13). Um clone colonizava seletivamente placa superficial a coroa hígida. Outro clone de menor incidência estava presente apenas no interior das lesões de cárie coronária e radicular. Foi possível notar que ao menos um clone presente nas placas dentais sobrepostas às lesões de cárie estavam também presentes no interior destas lesões.

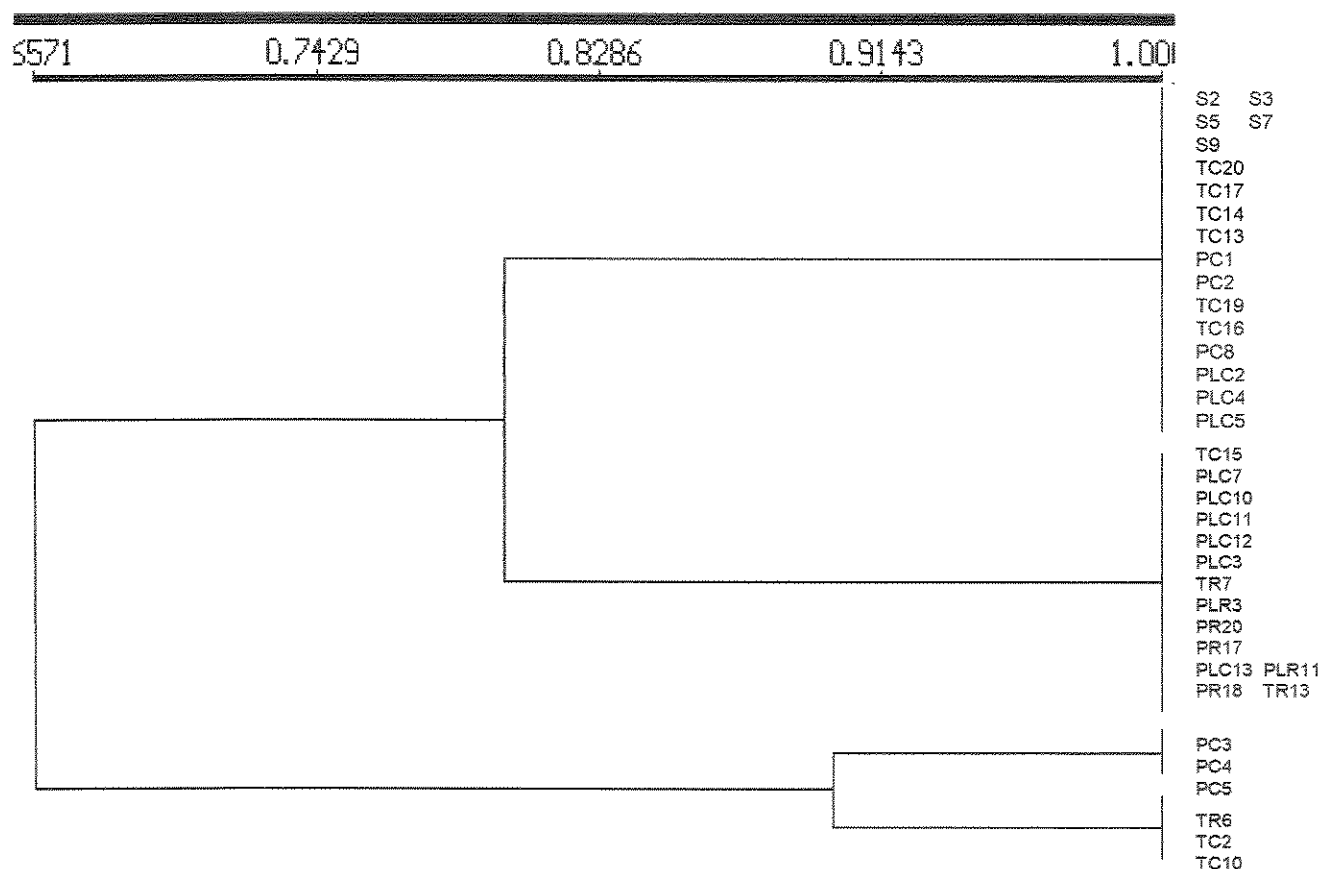


FIGURA 13: Dendrograma representativo do agrupamento de perfis genéticos idênticos de *S. mutans* determinados pela AP-PCR, e ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário 7.

O voluntário 8 apresentou colonização por quatro genótipos, sendo que dois destes colonizaram seletivamente a lesão radicular e placa sobreposta a esta lesão (FIG. 14). Os mesmos clones colonizadores da placa superficial a lesão coronária foram também encontrados no interior desta mesma lesão. Enquanto apenas um clone colonizador da placa superficial a raiz cariada estava também presente na lesão radicular.

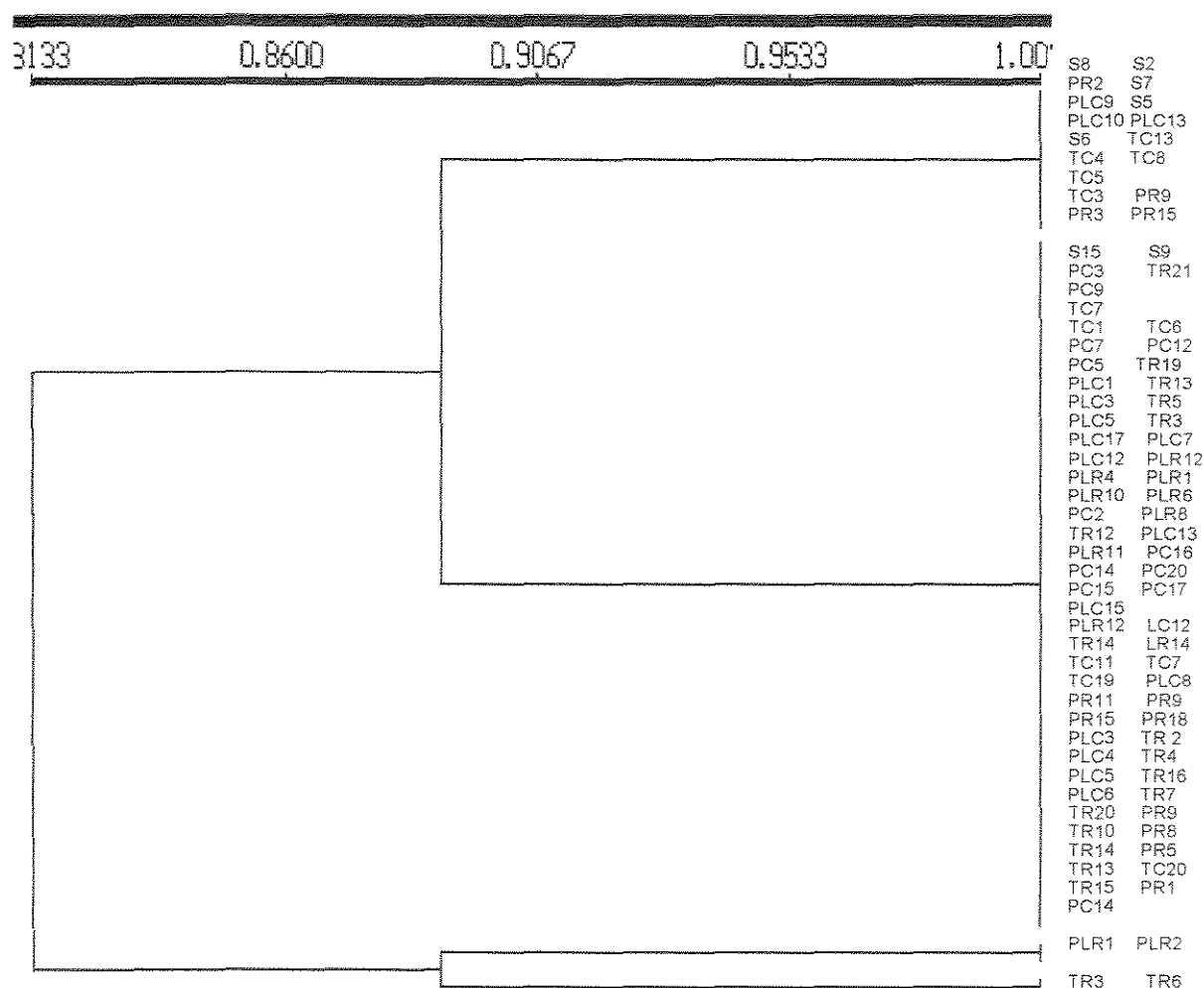


FIGURA 14: Dendrograma representativo do agrupamento de perfis genéticos idênticos de *S. mutans* determinados pela AP-PCR, e ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário 8.

Dois tipos genéticos puderam ser encontrados nos sítios pesquisados da cavidade bucal do voluntário 9 (FIG. 15). Assim como observado em outros voluntários, a placa sobreposta a lesão cariosa tanto coronária como radicular, mostrou-se colonizada por um clone também encontrado no interior da lesão.

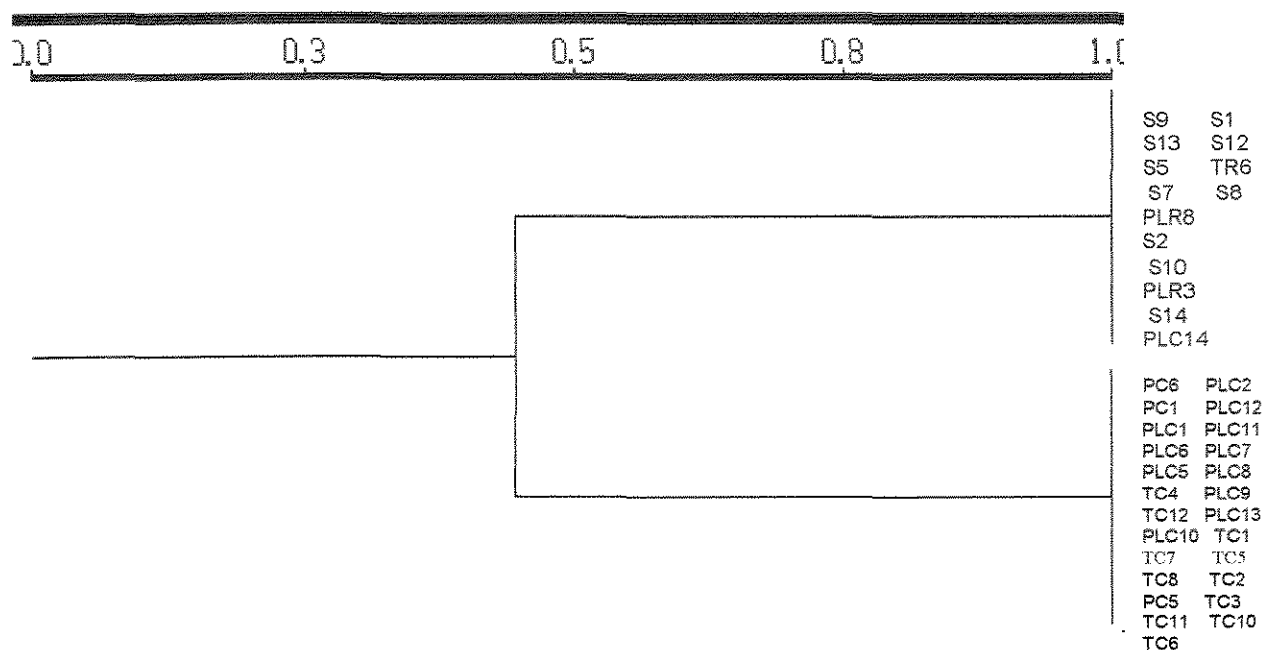


FIGURA 15: Dendrograma representativo do agrupamento de perfis genéticos idênticos de *S. mutans* determinados pela AP-PCR, e ocorrendo simultaneamente na cavidade bucal do voluntário 9.

Após a determinação dos perfis AP-PCR de *S. mutans* de todos os voluntários, um representante de cada clone foi utilizado para se obter o dendrograma apresentado na FIG. 16. O valor de similaridade máxima ($S_{SM} = 0,960$) foi encontrado somente entre tipos clonais oriundos do mesmo indivíduo.

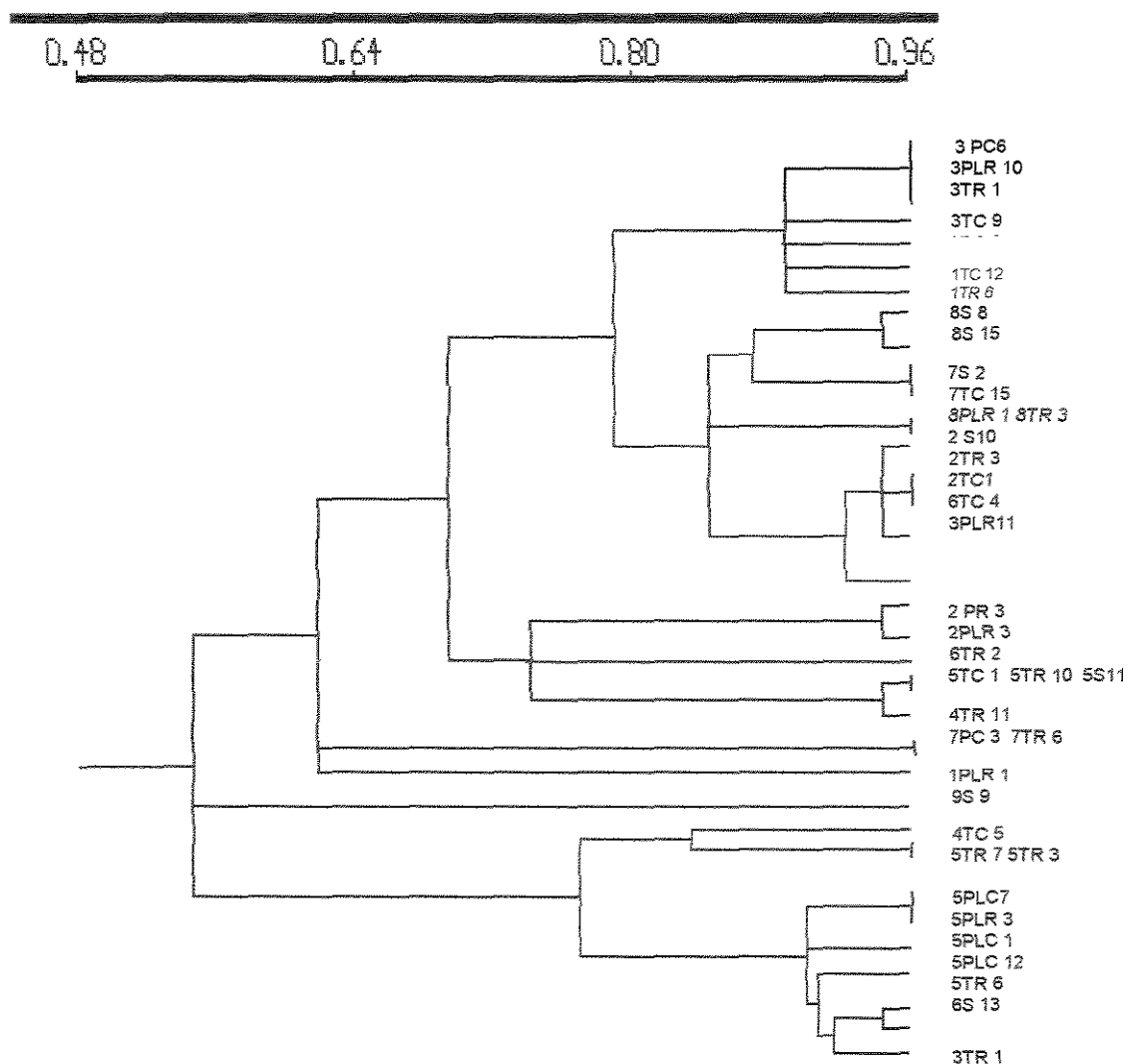


FIGURA 16: Dendrograma representativo do agrupamento de tipos genéticos de *S. mutans*

ocorrendo nas cavidades bucais dos voluntários, determinados pela AP-PCR.

Observações finais com relação aos dendrogramas apresentados merecem ser destacadas. Analisando-se cada sítio separadamente, foi possível notar que a saliva dos voluntários albergava clones que estavam presentes em todos os outros sítios, mas não necessariamente agrupou todos os distintos clones.

Em sete voluntários, clones identificados na placa dental sobreposta a lesão de cárie foram os mesmos encontrados na placa sobreposta a superfície sadia principalmente com relação a superfície coronária. Entretanto, os padrões de AP-PCR presentes na placa dental acima de superfícies sadias não apresentaram nenhum perfil diferenciado.

Clones encontrados em placa dental sobreposta a lesão de cárie, tanto coronária como radicular, são também encontrados no interior da lesão, e este fato foi observado durante a análise de oito voluntários. Porém, não necessariamente todos os clones presentes na placa estiveram presentes no interior da lesão.

No interior das lesões de cárie, tanto coronária como radicular, foi notado uma frequência maior de clones que não foram encontrados em nenhum outro sítio, isso pode ser verificado na análise de seis voluntários.

Um mesmo clone presente na lesão de cárie coronária estava presente também na lesão radicular, fato este observado em sete voluntários, entretanto em seis destes voluntários as lesões coronária e/ou radicular apresentaram genótipos que não estavam presentes na outra lesão de cárie.

6. DISCUSSÃO

Entre os métodos de identificação de do grupo mutans, a morfologia de colônia em placas do meio seletivo MSB permite uma diferenciação inicial e provisória (HAMADA & SLADE, 1980). Após os procedimentos de identificação das espécies isoladas neste estudo, foi possível confirmar a morfologia descrita por WHILEY & BEIGHTON (1998), com *S. mutans* agrupados em colônias brancas, rugosas, crescidas tanto na superfície como no interior do meio de cultura, e pode ser observado ocasionalmente um líquido em forma de gota (glucanos insolúveis em água) no topo das colônias. As colônias de *S. sobrinus* apresentaram uma característica mais irregular, com uma superfície lisa ou mesmo rugosa e freqüentemente a presença de um halo branco leitoso ao redor do crescimento bacteriano.

As bactérias orais podem apresentar uma capacidade de fermentação de determinados açúcares que é reconhecida por contribuir para a sobrevivência e multiplicação destes microrganismos na cavidade bucal (USHIRO *et al.*, 1991). A fermentação da melibiose é um dos testes bioquímicos usados para distinguir os isolados de *Streptococcus* do grupo mutans. Isolados representativos de *S. sobrinus* não fermentam a melibiose, e em média 88% de isolados recentes de *S. mutans* fermentam melibiose (BEIGHTON *et al.*, 1991).

Neste estudo, a proporção de *S. mutans* não fermentadores de melibiose pode ser considerada alta (28,7%), e em dois indivíduos colonizados por ambos fermentadores e não da melibiose, os não fermentadores representaram a maioria dos isolados. Esse

resultado se aproxima do resultado obtido no estudo de GRÖNROOS & ALALUUSUA (2000), onde foi apresentado que dentre os isolados *S. mutans*, 39% não fermentaram melibiose, enquanto no estudo de BEIGHTON *et al.* (1991) apenas 12% dos isolados *S. mutans* não apresentaram a capacidade de fermentar este mesmo açúcar .

De acordo com USHIRO *et al.* (1991), é possível que o fenótipo melibiose-negativo dos isolados *S. mutans* possa ser atribuído a incapacidade desses microrganismos em transportar a melibiose através da membrana celular, ou mesmo ser atribuído a ausência da enzima α -galactosidase, enzima responsável pela clivagem da melibiose em monossacarídeos.

Autores como HARDIE (1986) têm proposto que a fermentação da rafinose e/ou melibiose são testes distintos. Entretanto, pode existir uma certa relação entre os caminhos do metabolismo destes açúcares que operam nos microrganismos. Isto porque, a ausência da enzima α -galactosidase pode também reduzir ou deletar a fermentação da rafinose. A fermentação residual pela produção de ácidos a partir da rafinose, pode ser devido ao fato deste açúcar ser usado por alguns microrganismos como substrato para outras enzimas como: frutotransferase, frutanasase, invertase e sacarose-6-fosfato hidrolase (USHIRO *et al.*, 1991). Desta forma, é aparente que a inclusão de ambos, fermentação da rafinose e melibiose, em uma série de testes bioquímicos para identificação de *Streptococcus* do grupo mutans, não constitui dois testes independentes. Os resultados deste estudo mostram que 53,4% dos *S. mutans* não fermentadores de melibiose, também não são capazes de fermentar a rafinose. E este fato pode ser indicativo de alguma relação genética entre os genes controladores destas atividades.

Diferenças comportamentais em relação a produção de ácidos a partir da fermentação de açúcares puderam ser observadas entre as espécies *S. mutans* e *S. sobrinus*. Este último, tem sido considerado mais acidogênico que as outras espécies pertencentes ao grupo mutans (de SOET *et al.*, 1989; KÖHLER *et al.*, 1995), sendo capaz de produzir ácido a partir da glicose mais rapidamente que *S. mutans* (de SOET *et al.*, 1989). Em um estudo (de SOET *et al.*, 1991) sobre o potencial cariogênico de isolados recentes das espécies *S. mutans* e *S. sobrinus*, verificou-se que *S. sobrinus* produziu significativamente mais ácido que *S. mutans* em valores de pH 6,5 e 5,0, sendo a espécie *S. sobrinus* considerada mais cariogênica em ratos submetidos a uma dieta rica em sacarose e glicose.

É importante lembrar que, embora a sacarose seja o carboidrato mais comumente usado como fonte de energia, outros açúcares podem também ser metabolizados com uma eficiência menor (TORTORA *et al.*, 1997). Neste estudo observou-se que o manitol foi fermentado após 48 horas do período de incubação em 51% das espécies de *S. sobrinus* isoladas, ou seja, apenas 49% fermentaram este açúcar nas primeiras 24 horas, enquanto todas as espécies de *S. mutans* fermentaram manitol neste mesmo período inicial. No estudo de BEIGHTON *et al.* (1991), 61% das espécies *S. sobrinus* isoladas foram capazes de fermentar o manitol, entre outros açúcares, nas primeiras horas do período de incubação, sendo também necessário um período adicional para a leitura dos resultados de identificação bioquímica. A exploração desses resultados pode contribuir para o nosso conhecimento a respeito do transporte de açúcares e mecanismos de utilização destes pelas espécies *S. mutans* e *S. sobrinus*, além de

favorecer a instituição de medidas preventivas à cárie dental, como a substituição de açúcares da dieta.

A comparação entre os dois métodos de identificação utilizados, provas bioquímicas e PCR, não evidenciou diferenças entre os resultados por eles obtidos, tanto em relação a média do número de *S. mutans* como *S. sobrinus*. Sendo assim demonstrado, que ambos os métodos são igualmente eficientes para identificação destas espécies de estreptococos grupo mutans. Entretanto, os testes bioquímicos não foram capazes de identificar 13% das amostras submetidas à este método. Em consideração a este fato, LIEBANA *et al.* (1993) afirmaram, baseado em seus resultados, que estes testes não permitem identificar a maioria dos isolados, sendo este fato, talvez uma desvantagem desta metodologia.

Entre as sete espécies que compõem o grupo mutans de estreptococos, *S. mutans* e *S. sobrinus* são as mais freqüentemente isoladas da cavidade bucal humana, e implicadas como os causadores primários da cárie dental. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, a espécie *S. mutans* foi encontrada em uma freqüência significativamente maior que as demais espécies do grupo mutans, sendo que entre as espécies *S. sobrinus*, *S. ferus* e *S. cricetus* não foram observadas diferenças significativas, estando de acordo com grande parte dos estudos envolvendo a doença cárie (ELLEN *et al.*, 1985; RAVALD *et al.*, 1986; BROWN *et al.*, 1986; KELTJENS *et al.*, 1987; van HOUTE *et al.*, 1990; HIROSE *et al.*, 1993; LYNCH & BEIGHTON, 1994; LUNDGREN *et al.*, 1996).

É aparente que os fatores microbianos que precedem e determinam a formação de placa dental e concomitante indução de cárie pela colonização de *S. mutans* e *S. sobrinus*, isolados de diferentes pacientes, não são sempre os mesmos, podendo ser constatado pela variação individual na frequência e distribuição dos microrganismos isolados da cavidade bucal dos voluntários deste estudo. Foi possível observar que em apenas um voluntário, a proporção de *S. mutans* e *S. sobrinus* não pode ser diferenciada. E ainda, em outro voluntário não foi detectada a presença de *S. sobrinus*.

A associação entre estreptococos grupo mutans e cárie de esmalte é bem conhecida (HAMADA & SLADE, 1980). Estudos sugerem que também existe uma associação entre cárie radicular e estes microrganismos (KELTJENS *et al.*, 1987; EMILSON *et al.*, 1988; BOWDEN, 1990).

Apesar das potenciais diferenças entre as propriedades físico-químicas do esmalte e raiz, um fator que sugere e determina a composição de aminoácidos da película adquirida, a colonização bacteriana destes dois tipos de superfícies tem demonstrado ser idêntica por estudos como de NYVAD & KILIAM (1987). Estes achados confirmam os resultados de outros estudos que elucidam a relativa importância da película na composição de depósitos bacterianos recentes, sugerindo que as características das várias superfícies duras da cavidade bucal não influencia significativamente a colonização bacteriana.

Em respeito à estas considerações, a frequência de isolamento de *S. mutans* apresentada por este trabalho não estabeleceu uma relação conclusiva, uma vez que o

sítio onde *S. mutans* foi encontrado em maior frequência foi a lesão de cárie radicular pelos testes bioquímicos, e lesão coronária por PCR, sendo que a comparação entre os dois sítios não apresentaram diferenças significativas por nenhum dos dois métodos.

Enfatizando a hipótese de alguns estudos que afirmam uma maior prevalência de *S. mutans* em superfícies cariadas, em comparação a superfícies sadias (BROWN *et al.*, 1986; KELTJENS *et al.*, 1988; BOWDEN, 1990), os resultados das identificações realizadas pela técnica de PCR reafirmam a mesma, pois também demonstraram diferenças significativas quando se comparou as placas dentais presentes nas superfícies sadias de esmalte com lesões de cárie e placas sobrepostas as estas lesões, ou seja, *S. mutans* foi mais prevalente em sítios que manifestam a doença cárie em superfície coronária. Porém comparando-se separadamente, placa dental sobrepostas à superfícies sadias de esmalte e raiz, e placa acima de superfícies cariadas de esmalte e raiz, não foram observadas diferenças significativas, ao contrário do relatado pelo estudo de van HOUTE *et al.* (1990), onde a proporção de *S. mutans* foi significativamente mais alta na placa associada as lesões de cárie do que na placa sobreposta a superfície sadia.

A técnica de AP-PCR tem sido comumente utilizada na discriminação inter e intra específico de isolados microbianos. Teoricamente iniciadores arbitrários geram um padrão de amplificação consistente para grupos de espécies relacionadas, e tem sido comumente aceito que qualquer polimorfismo observado entre indivíduos ou espécies relacionadas, são devido a modificações no pareamento das bases por mutações, deleções ou inserção de elementos genéticos.

Os primers arbitrários utilizados na técnica de AP-PCR, OPA-02 e OPA-13 mostraram ser eficientes para gerar padrões eletroforéticos suficientemente distinguíveis, assim como relataram LI & CAUFIELD (1998) e SAARELA *et al.* (1996). Como a seleção destes primers arbitrários foram baseados na qualidade e número de amplicons produzidos por sequência específica, a diferença nos padrões de amplificação observados provavelmente reflete nas seqüências genéticas diferentes entre espécies de *S. mutans*. Este fato é além disso suportado pela observação de que os amplicons variam em função dos primers usados. Assim como observado por LI & CAUFIELD (1998), neste estudo algumas bandas eletroforéticas apareceram mais comumente entre os isolados, sugerindo que estes podem representar seqüências preservadas e serem futuramente usadas na construção de sondas genéticas para rápida identificação de espécies de estreptococos grupo mutans.

A análise da diversidade clonal intraindividual de *S. mutans* isolados de saliva, placa dental e tecido cariado, realizada neste estudo demonstrou que os indivíduos foram colonizados por dois a dez genótipos diferentes, e que a frequência e distribuição destes difere com relação aos locais de isolamento. Estes dados corroboram com a hipótese de que mais de um genótipo de estreptococos grupo mutans pode ser encontrado em um único indivíduo, demonstrada por autores como CAUFIELD & WALKER (1989), KULKARNI *et al.* (1989), KOZAI *et al.* (1991), SAARELA *et al.* (1993), ALALUUSUA *et al.* (1994). Segundo ALALUUSUA *et al.* (1996), um maior número de genótipos podem ser encontrados se mais isolados forem estudados, no entanto, no presente estudo foi

possível observar que um número maior de cepas analisadas não se relaciona com um número de perfis genéticos.

Embora as informações sobre a distribuição de genótipos de estreptococos grupo mutans em superfícies dentais sejam limitadas, os resultados encontrados no presente estudo foram confirmados por um trabalho recentemente divulgado por EMANUELSSON (2001) sobre a distribuição, aquisição e persistência de *S. mutans* em famílias e em locais da cavidade bucal. *Streptococcus mutans* isolados da placa dental de diferentes dentes da cavidade, foram genotipados através de análises de endonuclease (REA) e RAPD, constatando-se que em cada indivíduo um mesmo genótipo pode ser encontrado em dois ou mais sítios diferentes, assim como um mesmo sítio pode ser colonizado por diferentes genótipos. Além disso, de acordo com este estudo genótipos de *S. mutans* persistiram por 4 a 7 meses nos mesmos sítios de coleta.

HOHWY *et al.* (2001) procuraram investigar o papel das propriedades relacionadas as bactérias, hospedeiro, ambiente e tempo, sobre a diversidade genética de 751 isolados *Streptococcus mitis* coletados da mucosa bucal e orofaríngea de crianças e adultos em um período de 9 a 10 meses. Comparando-se ao observado em outras populações de bactérias, como *Escherichia coli*, a variabilidade genética da espécie *S. mitis* ($S_{SM} = 0,69$ e $0,76$), assim como a variabilidade genética de *S. mutans* ($S_{SM} = 0,72$) encontrada em nosso estudo podem ser consideradas altas. Os autores puderam concluir que, em contraste com o conceito de ecossistema climax, os sítios analisados foram caracterizados por uma sucessão de clones preferivelmente a estabilidade destes.

Em concordância com os achados de CAUFIELD & WALKER (1989) e LI & CAUFIELD (1995), neste estudo um mesmo clone de *S. mutans* não foi isolado na cavidade bucal de indivíduos sem proximidade familiar. À exceção dos casos de pares mãe-filho e irmão-irmão, estes autores mostraram que os clones obtidos por comparações dos *fingerprints* de DNA cromossômico de isolados bacterianos de dois indivíduos são genotipicamente diferentes.

Procurando analisar as características fenotípicas e variabilidade genética possivelmente existente entre as espécies de *S. mutans* identificadas pelas provas bioquímicas e PCR, foram correlacionadas as 128 (70,3%) espécies *S. mutans* fermentadoras e as 54 (29,6%) não fermentadoras do açúcar melibiose. Em dois voluntários, isolados fermentadores e não fermentadores deste açúcar puderam ser distinguidos pela tipagem da técnica de AP-PCR. Este resultado está de acordo com o apresentado pelo estudo de GRÖNROOS & ALALUUSUA (2000), onde isolados com estes mesmos perfis fenotípicos foram também representativos de padrões de AP-PCR distintos.

No presente estudo, apenas um voluntário não apresentou colonização por *S. sobrinus* em quaisquer dos nichos pesquisados durante o período de coleta das amostras. Coincidência ou não, este mesmo paciente apresentou um número consideravelmente maior de clones de *S. mutans*. Estes dois fatos podem ser independentes ou intimamente associados. Em respeito a estas considerações, está uma hipótese relatada por NYVAD & KILIAN (1990), onde é afirmado que a predominância de uma única espécie acidogênica pode refletir em uma atividade maior de cárie, em contraste, a alta complexidade da

microbiota indica baixo potencial cariogênico. No entanto, cabe ressaltar que não podem ser relacionados a indicadores de risco de cárie deste paciente, uma vez que não houve diferenças marcantes entre o índice CPO com relação aos demais voluntários. A possível associação entre número de espécies isoladas, número de genótipos de cada espécie e atividade de cárie merece maiores esclarecimentos.

A despeito do baixo número de isolados e sítios analisados, grande parte dos estudos envolvendo diversidade genética de estreptococos grupo mutans e atividade de cárie, têm apresentado resultados conflitantes (ALALUUSUA *et al.*, 1996; KREULEN *et al.*, 1997). No presente estudo, foram genotipadas 438 espécies de *S. mutans* isoladas de diferentes sítios da cavidade bucal dos voluntários. De particular interesse com os objetivos deste estudo, foi possível observar que clones de *S. mutans* colonizadores da lesão de cárie coronária estavam também presentes na lesão radicular em sete voluntários, sugerindo talvez uma possível etiologia comum para estes dois tipos de cárie dental.

7. CONCLUSÕES

- ✓ *S. mutans* é a espécie de estreptococos grupo mutans encontrada em maior número tanto em superfícies que não manifestam a doença cárie, como em superfícies cariadas, e isto pode ser aplicado tanto para o esmalte como raiz dental.
- ✓ A técnica de AP-PCR detecta a variabilidade genética de *S. mutans* isolados da cavidade oral de indivíduos com cárie dental.
- ✓ Diferentes tipos clonais detectados na cavidade oral de um indivíduo apresentam diferentes propriedades fenotípicas.
- ✓ Não há relação direta entre os genótipos de *S. mutans* e os dois tipos de lesões cariosas estudadas, sendo observado que múltiplos genótipos (entre 2 e 10) colonizavam aleatoriamente os diversos sítios da cavidade oral de um mesmo indivíduo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABO, H. *et al.* Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water-insoluble glucan synthetase), **J Bacteriol**, Washington, v.173, p.989-996, Feb. 1991.
2. 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.
3. 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.
4. ALAM, S. *et al.* Genotypic heterogeneity of *Streptococcus oralis* and distinct aciduric subpopulations in human dental plaque, **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.66, n.8, p.3330-3336, 2000.
5. BANTING, D.W.; ELLEN, R.P.; FILLERY, E.D. Prevalence of root surface caries among institutionalized older persons, **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.8, n.2, p.84-88, Apr. 1980.
6. BECK, J.D. The epidemiology of root caries: North American studies, **Adv Dent Res**, Washington, v.7, n.1, p.42-51, July 1993.
7. BECK, J.D. The epidemiology of root surface caries, **J Dent Res**, Washington, v.69, n.5, p.1216-1221, May. 1990.
8. BEIGHTON, D.; BRAILSFORD, S.R. Plaque microbiology of root caries. *In*: EDGAR, W.M. & O'MULLANE, D.M. **Saliva and oral health**, London,

British Dental Association, 1999, 2 ed., p.295-313.

9. BEIGHTON, D. *et al.* *S. macacae* sp. from dental plaque of monkeys, ***Int J Syst Bact***, Washington, v.34, p.332-335, 1984.
10. BEIGHTON, D.; RUSSEL, R.R.B.; WHILEY, R.A. A simple biochemical scheme for the differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, ***Caries Res***, Basel, v.25, n.3, p.174-178, 1991.
11. BEIGHTON, D.; LYNCH, E.; HEALTH, M.R. A microbiological study of primary root-caries lesions with different treatment needs, ***J Dent Res***, Washington, v.72, n.3, p.623-629, Mar. 1993.
12. BOWDEN, G.H.W. Microbiology of root surface caries in humans, ***J Dent Res***, Washington, v.69, n.5, p.1205-1210, May. 1990.
13. BRADY, L.J. *et al.* Differentiation of salivary agglutinin-mediated adherence and aggregation of mutans streptococci by use of monoclonal antibodies against the major surface adhesin P1, ***Infect Immun***, Washington, v.60, n.3, p.1008-1017, Mar. 1992.
14. BRATTHALL, D. Demonstration of five serological groups of streptococcal strain resembling *S. mutans*, ***Odontol Revy***, Malmo, v.21, n.2, p. 143-152, 1970.
15. BROWN, L.R.; BILLINGS, R.J.; KASTER, A.G. Quantitative comparisons of potentially cariogenic microorganisms cultured from non-carious and carious root and coronal tooth surfaces, ***Infect Immun***, Washington, v.51, n.3, p.765-770, Mar. 1986.
16. BURT, B.A.; ISMAIL, A.I.; EKLUND, S.A. Root caries in optimally fluoride and high-fluoridated community, ***J Dent Res***, Washington, v.65, n.9, p.1154-

1158, Sept 1986.

17. CANGELOSI, G.A. *et al.* Oligonucleotide probes for mutans streptococci, ***Mol Cell Probes***, v.8, n.1, p.73-80, Feb. 1994.
18. CAUFIELD, P.W.; WALKER, T.M. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphism, ***J Clin Microbiol***, Washington, v.27, n.2, p.274-278, Feb. 1989.
19. 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***, Washington, v.72, n.1, p.37-45, Jan. 1993.
20. COLBY, S.M.; HARRINGTON, D.J.; RUSSELL, R.R.B. Identification and genetic characterization of melibiose-negative isolates of *Streptococcus mutans*, ***Caries Res***, Basel, v.29, n.5, p.407-412, 1995.
21. CORBETT, M.E.; MOORE, W.J. Distribution of caries in ancient British populations IV. The 19 th century, ***Caries Res***, Basel, v.10, n.6, p.401-414, 1976.
22. COYKENDALL, A.L. Base composition of deoxyribonucleic acid isolated from cariogenic streptococci, ***Arch Oral Biol***, Oxford, v.15, p.365, 1970.
23. de SOET, J.J. *et al.* Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*, ***Caries Res***, Basel, v.25, n.2, p.116-122, 1991.
24. de SOET, J.J.; TOORS, F.A.; de GRAAF, J. Acidogenesis by oral streptococci at different pH values, ***Caries Res***, Basel, v.23, n.1, p.14-17, 1989.

25. ELLEN, R.P.; BANTING, D.W.; FILLERY, E.D. Longitudinal microbiological investigation of a hospitalized population of older adults with a high root surface caries risk, **J Dent Res**, Washington, v.64, n.12, p.1377-1381, Dec. 1985.
26. 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.
27. EMILSON, C.G.; KLOCK, B.; SANFORD, C.B. Microbial flora associated with presence of root surface caries in periodontally treated patients, **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.96, n.1, p.40-49, Feb. 1988.
28. FEATHERSTONE, J.D.B. Fluoride, remineralization and root caries, **Am J Dent**, Washington, v.7, n.5, p.271-274, Oct. 1994.
29. FEJERSKOV, O. Recent advancements in the treatment of root caries, **Int Dent J**, Surrey, v.44, n.2, p.139-144, Apr. 1994.
30. FIRESTONE, A.R. *et al.* In vitro demineralization by strains of *Actinomyces viscosus* and *Streptococcus sobrinus* of sound and demineralized root surfaces, **J Dent Res**, Washington, v.72, n.8, p.1180-1183, Aug. 1993.
31. 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, June 1991.
32. FURE, S.; ZICKERT, I. Root surface caries and associated factors, **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.98, n.5, p.391- 400, Oct. 1990.

33. FURSETH, R.; JOHANSEN, E. A microradiographic comparison of sound and carious human dental cementum, ***Arch Oral Biol***, Oxford, v.13, n.10, p.1197-1206, Oct. 1968.
34. GOLD, O.G.; JORDAN H.V.; van HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*, ***Arch Oral Biol***, Oxford, v.18, p.1357-1364, 1973.
35. 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.
36. HAMADA, S.; SLADE, H.D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*, ***Microbiol Rev***, v.44, n.2, p.331-384, June 1980.
37. HAND, J.S.; HUNT R.J.; BECK, J.D. Coronal and root caries in older Iowans: 36-month incidence, ***Gerodontology***, v.4, p.136-139, 1988.
38. HARDIE, J.M. Oral Streptococci. In: SNEATH, P.H.A; MAIR, N.S; SHARPE, M.E. & HOLT, J.G. ***Bergey's Manual of Systematic Bacteriology***, Baltimore, v.2., p. 1054-1063, 1986.
39. HAZEN, S.P.; CHILTON, N.W.; MUMMA, R.D. The problem of root caries: Literature review and clinical description, ***J Am Dent Assoc***, Chicago, v.86, n.1, p.137-1444, Jan. 1973.
40. HIROSE, H. *et al.* Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth-surface caries increment, ***Caries Res***, Basel, v.27, n.4, p.292-297, 1993.
41. HOHWY, J.; REINHOLDT, J.; KILIAN, M. Population dynamics of *Streptococcus*

mitis in its natural habitat, **Infect Immun**, Washington, v.69, n.10, p.6055-6053, Oct. 2001.

42. HONDA, O.; KATO, C.; KURAMITSU, H.K. Nucleotide sequence of the *Streptococcus mutans* *gtfD* gene encoding the glucosyltransferase S-enzyme, **J Gen Microbiol**, Cambridge, v.136, n.10, p.2099-2105, Oct. 1990.
43. HOPPENBROUWERS, P.M.M. *et al.* The mineral solubility of human tooth roots, **Arch Oral Biol**, Oxford, v.32, n.5, p.319, 1987.
44. IDA, H. *et al.* A DNA probe specific to *Streptococcus sobrinus*, **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.14, n.4, p.233-237, Aug. 1999.
45. IGARASHI, T. *et al.* Polymerase chain reaction for identification of oral streptococci: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus downei* and *Streptococcus salivarius*, **J Microbiol Methods**, v.34, n.1, p.81-88, Sept 1998.
46. JONES, C.L.; SAXTON, C.A.; RITCHIE, J.A. Microbiological and clinical effects of a dentifrice containing zinc citrate and triclosan in the human experimental gingivitis model, **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v.17, n.8, p.570-574, Sep. 1990.
47. JORDAN, H.V.; HAMMOND, B.F. Filamentous bacteria isolated from human root surface caries, **Arch Oral Biol**, Oxford, v.17, n.9, p.1333-1342, Sept 1972.
48. KATZ, R.V. Clinical signs of root caries: measurement issues from an epidemiological perspective, **J Dent Res**, Washington, v.69, n.5, p.1211-1215, May. 1990.
49. KATZ, R.V. *et al.* Prevalence and intraoral distribution of root caries in an adult

population, **Caries Res**, Basel, v.16, n.3, p.265-271, 1982.

50. KELSTRUP, J. *et al.* Fingerprinting human oral streptococci by bacteriocin production and sensitivity, **Arch Oral Biol**, Oxford, v.15, n.10, p.1109-1116, Dec. 1970.
51. KELTJENS, H. *et al.* Microflora of plaque from sound and carious root surfaces, **Caries Res**, Basel, v.21, n.3, p.193-199, 1987.
52. KELTJENS. H. *et al.* Preventive aspects of root caries, **Intern Dent J**, Guildford, v.43, n.2, p.143-148, Apr. 1993.
53. KIDD, E.A. Root caries, **Dent Update**, Guildford, v.16, n.3, p.93-100, Apr. 1989.
54. KITAMURA, M.; KIYAK, H.A.; MULLIGAN, K. Predictors of root caries in the elderly, **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.14, n.1, p.34-38, Feb. 1986.
55. KÖHLER, B.; BIRKED, D.; OLSSON, S. Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, **Caries Res**, Basel, v.29, n.5, p.402-406, 1995.
56. KOZAI, K. *et al.* Changes in strains of mutans streptococci induced by treatment with chloreixidine varnish, **J Dent Res**, Washington, v.70, n.9, p.1252-1257, Sept 1991.
57. KRAL, T.A.; DANEO-MOORE, L. Biochemical differentiation of certain oral streptococci, **J Dent Res**, Washington, v.60, n.9, p.1713-1718, Sept 1981.
58. KREULEN *et al.* *Streptococcus mutans* in children using nursing bottles, **ASDC J Dent Child**, v. 64, n.2, p.107-111, Mar-Apr. 1997.

59. KULKARNI, G.V.; CHAN, K.H.; SANDHAM, H.J. An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of mutans streptococci, **J Dent Res**, Washington, v.68, n.7, p.1155-1161, July 1989.
60. LI, Y.; CAUFIELD, P.W. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans, **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.13, p.17-22, Feb. 1998.
61. LI, Y.; WANG, W.; CAUFIELD, P.W. The fidelity of mutans streptococci transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among Chinese families, **Caries Res**, Basel, v.34, n.2, p. 123-132, Mar-Apr. 2000.
62. LIEBANA, J. *et al.* Phenotypic characterization of oral streptococci by classical methods, **Microbios**, Cambridge, v.76, n.306, p.7-18., 1993.
63. LOESCHE, W.H.J. Chemotherapy of dental plaque infections, **Oral Sci Rev**, v.9, p.65-107, 1976.
64. LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in dental decay, **Microbiol Rev**, v.50, n.4, p.353-380, Dec. 1986.
65. LUNDGREN, M.; EMILSON, C.G.; ÖSTERBERG, T. Caries prevalence and salivary and microbial conditions in 88-year-old Swedish dentate people, **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.54, n.3, p.193-199, June 1996.
66. LYNCH, E.; BEIGHTON, D. A comparison of primary root caries lesions classified according to color, **Caries Res**, Basel, v.28, n.4, p. 233-239, 1994.
67. MACENTEE, M.I.; WYATT, C.C.L.; McBRIDE, B.C. Longitudinal study of caries

and cariogenic bacteria in an elderly disabled population, **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.18, n.3, p.149-152, June 1990.

68. MAIDEN, M.F.J.; LAI, C.H.; TANNER, A. Characteristics of oral gram-positive bacteria, **Contemporary Oral Microbiol Immun**, p.342-372, 1992
69. MARSH, P.D. Host defenses and microbial homeostasis: role of microbial interactions, **J Dent Res**, Washington, v. 68, p.1567-1575, 1989.
70. MARSH, P.D. Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque, **Proc Finn Dent Soc**, v.87, n.4, p.515-525, 1991.
71. 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, 1998.
72. MATTOS-GRANER, R.O. *et al.* Genotypic diversity of mutans streptococci in brazilian nursery children suggests horizontal transmission, **J Clin Microbiol**, Washington, v.39, n.6, p.2313-2316, June 2001.
73. McINTYRE, J. Dental root surface caries study, **Aust Dent J**, Saint Leonards, v.45, n.4, p.141-200, Dec. 2000.
74. MESKIN, L.H. *et al.* Economic impact of dental service utilization by older adults, **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.120, n.6, p.665-668, June 1990.
75. NYVAD, B.; FEJERSKOV, O. Root surface caries: clinical, histopathological and microbiological features and clinical implications, **Intern Dent J**, Guildford, v.32, n.4, p.312-26, Dec. 1982.
76. NYVAD, B.; FEJERSKOV. Assessing the stage of caries lesion activity on the

basis of clinical and microbiological examination, **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.25, n.1, p.69-75, Feb. 1997.

77. NYVAD, B.; KILIAN, M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*, **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.95, n.5, p.369-80, Oct. 1987.
78. NYVAD, B.; KILIAN, M. Microflora associated with experimental root surface caries in humans, **Infect Immun**, Washington, v.58, n.6, p.1628-1633, June 1990.
79. OHO, T. *et al.* Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction, **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.15, n.4, p.258-262, Aug. 2000.
80. PAN, Y.P.; LI, Y.; CAUFIELD, P.W. Phenotypic and genotypic diversity of *Streptococcus sanguis* in infants, **Oral Microbiol Immun**, Copenhagen, v.16, n.4, p.235-242, Aug. 2001.
81. PHANKOSOL, P. *et al.* Depth of penetration of *in vitro* root surface lesions, **J Dent Res**, Washington, v.64, n.6, p.897-899, June 1985.
82. QUIRYNEN, M. *et al.* The effect of periodontal therapy on the number of cariogenic bacteria in different intra-oral niches, **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v.26, n.5, p.322-327, May. 1999.
83. RAVALD, N. & BICKERD, D. Factors associated with active and inactive root caries in patients with periodontal disease, **Caries Res**, Basel, v.25, n.5, p.377-384, 1991.
84. RAVALD, N. *et al.* Long-term evaluation of root surface caries in periodontally

treated patients, *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v.13, n.8, p.758, Sept 1986.

85. RAVALD, N. *et al.* Root caries susceptibility in periodontally treated patients: results after 12 years, *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v.20, n.2, p.124-125, Feb. 1993.
86. REIKER, J. *et al.* A cross-sectional study into the prevalence of root caries in periodontal maintenance patients, *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v.26, n.1, p.26-32, Jan. 1999.
87. 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, Mar. 1993.
88. SAARELA, M. *et al.* Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction, *Archs Oral Biol*, Oxford, v.41, n.8/9, p.821-826, Aug-Sept 1996.
89. SAIKI, R.K. *et al.* Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, Washington, v.239, n. 4839, p.487-491, Jan. 1988.
90. SCHAMSCHULA, R.G. *et al.* Prevalence and interrelationship of root surface caries in Lufa, Papua, New Guinea, *Community Dent Oral Epidemiol*, Oxford, v.2, n.6, p.295-304, 1974. *Apud*: SEICHTER, U. Root surface caries: a critical literature review, *J Am Dent Ass*, Chicago, v.115, n.2, p.305-310, Aug. 1987.
91. SCHÜPBACCH, P.; OSTERWALDER, V.; GUGGENHEIM, B. Human root

caries: microbiota in plaque covering sound, carious and arrested carious root surfaces, ***Caries Res***, Basel, v.29, n.5, p.382-395, 1995.

92. SCHÜPBACH, P. *et al.* Human root caries: microbiota of a limited number of root caries lesions, ***Caries Res***, Basel, v.30, n.1, p.52-64, 1996.
93. SEICHTER, U. Root surface caries: a critical literature review, ***J Am Dent Ass***, Chicago, v.115, n.2, p.305-310, Aug. 1987.
94. 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.
95. SHIROZA, T.; UEDA, S.; KURAMITSU, H.K. Sequence analysis of the *gtfB* gene from *Streptococcus mutans*, ***J Bacteriol***, Washington, v.169, n.9, p.4263-4270, 1987.
96. SHKLAIR, I.L.; KEENE, H.J. A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *S. mutans*, ***Archs Oral Biol***, Oxford, v.19, n.11, p.1079-81, Nov. 1974.
97. SHU, M. Study of root caries in an artificial mounth, ***N. Z. Dent. J.***, v.94, n.416, p.62-64, June 1998.
98. SIMMONDS, R.S.; TOMPKINS, G.R.; GEORGE, R.J. Dental caries and the microbial ecology of dental plaque: a review of recent advances, ***N. Z. Dent. J.***, v.96, p.44-49, 2000.
99. SMITH, D.J. *et al.* Association of salivary immunoglobulin A antibody and initial mutans streptococcal infection, ***Oral Microbiol Immunol***, Copenhagen, v.13,

n.5, p.278-285, Oct. 1998.

100. SMORAWINSKA, M.; KURAMITSU, H.K. DNA probes for detection of cariogenic *Streptococcus mutans*, **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.7, n.3, p.177-181, June 1992.
101. SOCRANSKY, S.S.; HUBERSAK, C.; PROPAS, D. Induction of periodontal destruction in gnotobiotic rats by a human oral *A. naeslundii*, **Archs Oral Biol**, Oxford, v.15, n.10, p.993-995, Oct. 1970.
102. SUMNEY, D.L. & JORDAN, H.V. Characterization of bacteria isolated from human root surface carious lesions, **J Dent Res**, Washington, v.53, n.2, p.343-351, Mar- Apr. 1974.
103. SUMNEY, D.L.; JORDAN, H.V.; ENGLANDER, H.R. The prevalence of root surface caries in selected populations, **J Periodontol**, Chicago, v.44, n.8, p.500-504, Aug. 1973.
104. SYED, I. *et al.* Predominant cultivable flora isolated from human root surface caries plaque, **Infect Immun**, Washington, v.11, n.4, p.727-731, Apr. 1975.
105. TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology: an introduction**. California: Addison Wesley Longman, 1997, 6 ed. p. 832.
106. TRUONG, T.L. *et al.* Identification of mutans and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis, **J Med Microbiol**, London, v.49, n.1, p.63-71, Jan. 2000.
107. TYLER, T. *et al.* Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens, **J Clin Microbiol**, Washington, v.35, n.2, p.339-346, Feb. 1997.

108. USHIRO, I. *et al.* Chromosomal deletions in melibiose-negative isolates of *Streptococcus mutans*, **J Dent Res**, Washington, v.70, n.11, p.1422-1426, 1991.
109. van DER REIJDEN, W.A. *et al.* Mutans streptococci in subgingival plaque of treated and untreated patients with periodontitis, **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v.28, n.7, p.686-691, July 2001.
110. van HOUTE, J. *et al.* Association of the microbial flora of dental plaque and saliva with human root-surface caries, **J Dent Res**, Washington, v.69, n.8, p.1463-1468, Aug. 1990.
111. van HOUTE, J.; GIBBS, G.; BUTERA, C. Oral flora of children with "nursing bottle caries.", **J Dent Res**, Washington, v.61, n.2, p.382-385, Feb. 1982.
112. VEHKALAHTI, M.; PAUNIO, I. Association between root caries occurrence and periodontal state, **Caries Res**, Basel, v.28, n.4, p.301-306, 1994.
113. WARREN *et al.* Dental Caries prevalence and dental care utilization among the very old, **J Am Dent Ass**, Chicago, v.131, n.11, p.1571-1579, 2000.
114. WEFEL, J.S. Root caries histopatology and chemistry, **Am J Dent**, San Antonio v.7, n.5, p.261-265, 1994.
115. WELSH, J.O.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, **Nucleic Acids Res**, Oxorford, v.18, n.24, p.7213-7218, Dec. 1990.
116. WEXLER, D.L.; HUDSON, M.C.; BURNE, R.A. *Streptococcus mutans* fructosyltransferase (ftf) and glucosyltransferase operon fusion strains in

continuons culture, *Infect Immun*, Washington, v.61, n.4, p.1259-1267, 1993.

117. WHILEY, R.A.; BEIGHTON, D. Current classification of the oral streptococci, *Oral Microbiol Immun*, Copenhagen, v.13, n.4, p.195-216, Aug. 1998.
118. WHILEY, R.A. *et al.* *Streptococcus downei* sp. Nov. for strains previously described as *S. mutans* serotype h, *Int J Syst Bacteriol*, Surrey, v.38, p. 25-29, 1988.
119. WHITTENBURY, R. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria, *J Gen Microbiol*, Cambridge, v.35, p.13-26, 1964.
120. WILLIAMS, J.G.K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Res*, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, Nov. 1990.
121. YOUNGS, G. Risk factors for and the prevention of root caries in older adults, *Spec Care Dent*, v.14, n.2, Mar-Apr. 1994.
122. ZAMBON, J.J. & KASPRZAK, S.A. The microbiology and histopatology of root caries, *Am J Dent*, New York, v.8, n.6, p.323-328, Dec. 1995.
123. ZHU, H.; WILLCOX, M.D.P.; KNOX, K.W. A new species of oral *Streptococcus* isolated from Sprague-Dawley rats, *Streptococcus orisratti* sp. Nov, *Int J Syst Evol Microbiol*, v.50, n.1, p.55-61, Jan. 2000.
124. ZINNER, D.O. & JABLON, J.M. Human streptococcal strain in experimental caries. In: HARRIS, R.S. *The art and science of dental caries research*. London: Academic Press, 1968.