



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



1290004946

TCC/UNICAMP
C14e
FOP

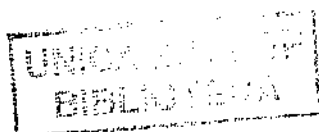
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno: Rodolfo Alberto Pires De Camargo
RA 064216

Orientadora: Prof. Dra. Regianne Umeko Kamiya

Ano de Conclusão do Curso:
2009



Regianne Kamiya

Assinatura da Orientadora

12-05-09

Rodolfo Alberto Pires De Camargo

**Espectro de atividade antimicrobiana de mutacinas
produzidas por *Streptococcus mutans* sobre
microrganismos de interesse médico e odontológico**

*Monografia apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas, como Trabalho de Conclusão
Curso de Graduação em Odontologia..*

Orientador: Profa. Dra. Regianne Umeko Kamiya

**PIRACICABA
2008**

Unidade - FOP/UNICAMP
FCC/UNICAMP
C14e Ed.
Vol. Ex.
Tombo 4946
C ☐ D ☒
Proc. 16P-134/10
Preço R\$ 11,00
Data 12/08/10
768355

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

C14e	Camargo, Rodolfo Alberto Pires de. Espectro de atividade antimicrobiana de mutacinas produzidas por <i>Streptococcus mutans</i> sobre microrganismos de interesse médico e odontológico. / Rodolfo Alberto Pires de Camargo. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009. 20f. : il. Orientador: Regianne Umeko Kamiya. Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Odontologia. I. Kamiya, Regianne Umeko. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
------	--

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais **Aparecido José Fernando Pires de Camargo e Dionéia Aparecida Quitério Pires de Camargo**, pela ajuda prestada durante todo o curso , pela educação e respeito que me ensinaram tornando este sonho realidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora **Regianne Umeko Kamiya** por ter tornado possível meu projeto de iniciação e posteriormente esta monografia e por seu apoio e orientação.

Ao Professor **Reginaldo Bruno Gonçalves** pela oportunidade de trabalhar com ele e realizar essa pesquisa.

A todos pesquisadores da área de Microbiologia pela colaboração e convívio.

Ao companheiro de graduação e iniciação científica **Tiago Taiete** pela amizade e auxílio durante todo curso.

A **Fapesp** (processo 06/60668-1) pela bolsa fornecida e pelo apoio acadêmico necessário.

SUMÁRIO

Listas.....1

Resumo.....3

Introdução.....5

Objetivos.....8

Materiais e métodos.....8

Resultados e Discussão.....13

Conclusão.....17

1. Listas

1.1 Listas de Tabelas

Tabela 1. Relação das cepas produtoras selecionadas para a detecção da atividade antimicrobiana de mutacinas *in vitro*.

Tabela 2. Sequência dos *primers* para os genes estruturais *mutA*, *nImA* e *nImB* das mutacinas.

1.3 Listas de Anexos

Anexo 1. Médias obtidas das contagens de UFC/ml (em triplicata) das cepas de *S. mutans* produtoras de mutacinas de amplo espectro, em diferentes meios de cultura e microaerofilia (M) ou anaerobiose(A).

Anexo 2. Médias obtidas das contagens de UFC/ml (em triplicata) das cepas indicadoras, em diferentes meios de cultura e microaerofilia (M) ou anaerobiose (A).

1.4 Listas de abreviaturas, siglas e palavras em outro idioma

et al. – e outros (abreviatura e “et alli”)

In vitro – Conjunto de reações que se realizam em tubos de ensaio ou em condições laboratoriais.

M – molaridade

mm – Milímetro

mL – mililitro

p – Nível de significância

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

pH – Potencial hidrogeniônico

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UFC/ml – Unidades Formadoras de Colônias por mL

μL - Microlitros

2. RESUMO

Bacteriocinas são proteínas capazes de inibir o crescimento de bactérias genética e ecologicamente relacionadas. A síntese de bacteriocinas ou mutacinas por *Streptococcus mutans* pode representar vantagens ecológicas à espécie *cariogênicas*, através do controle e diminuição da população de microrganismos competidores na cavidade oral.

Neste presente estudo, foram analisados o espectro de ação inibitório de substâncias semelhantes às mutacinas contra diferentes cepas de interesse médico e odontológico. Em adição, foram traçados os perfis de sensibilidade de cepas de interesse médico aos diferentes antibióticos usuais.

A mutacinotipagem foi realizada para a determinação do espectro inibitório (atividade antimicrobiana) de 16 cepas selecionadas de *S. mutans*, produtoras de mutacinas de amplo espectro inibitório contra 55 espécies indicadoras de interesse médico e odontológico, pelo método descrito por Kamiya *et al.* (2005a). Para a realização da mutacinotipagem, as cepas de *S. mutans* congeladas em BHI glicerol (10%) foram reativadas em 5ml de BHI e incubadas em microaerofilia (10% CO₂) a 37° C por 18 horas. Após o acerto da concentração celular correspondente a 10⁸ UFC/mL (D.O aproximada de 0,1 a 0,5 - 550nm lidos em espectrofotômetro) as 16 cepas produtoras de mutacinas foram inoculadas em placas de TSA 1,5% em picadas eqüidistantes. Essas placas foram incubadas por 48 horas em microaerofilia, e após este período, foram vertidos sobre a placa 5ml de TSA 0,8% contendo 0,5 ml de uma cultura *overnight* em TSB de uma cepa indicadora (aproximadamente 10⁸ UFC/mL). Todos os testes foram realizados em duplicata. Os diâmetros dos halos inibitórios foram medidos após 24 horas de incubação em microaerofilia, considerando-se positiva a produção de mutacinas quando da presença de halos

com diâmetro maior que 6 mm (WU *et al.*, 2004).

Adicionalmente, foi realizado o antibiograma para traçar os perfis de sensibilidade das cepas indicadoras de interesse médico frente a alguns dos principais medicamentos utilizados atualmente na antibioticoterapia, sendo as cepas indicadoras classificadas como sensíveis, moderadamente sensíveis, intermediária ou resistentes, de acordo com as normas pré-estabelecidas pelo CLSI. Utilizando-se um swab estéril, culturas *overnight* das cepas indicadoras foram inoculadas na concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml na superfície do agar Muller Hinton. Após secagem os discos de antibióticos (benzil penicilina, ampicilina, amoxicilina, imipinem, vancomicina, azitromicina, estreptomicina e tetraciclina) foram depositados eqüidistantes e de maneira asséptica sobre as placas contendo Agar Muller Hinton. Após 24 horas de crescimento, em condições favoráveis para cada cepa indicadora, foi realizada a medição dos diâmetros dos halos inibitórios. Para controle de qualidade dos discos de antibióticos empregados foram utilizadas as cepas *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Verificou-se a sensibilidade de cepas de interesse médico, resistentes aos antibióticos usuais, às mutacinas de amplo espectro antimicrobiano.

A determinação das atividades antimicrobianas de substâncias semelhantes às mutacinas, produzidas por isolados de *S. mutans*, contra cepas indicadoras de interesse odontológico e médico, resultam em maior compreensão das relações inter-espécies presentes em um biofilme dental, assim como avaliar possíveis aplicações de bacteriocinas nas áreas médico-biotecnológicas, respectivamente.

3. Introdução

3.1. Revisão de literatura

O corpo humano abriga mais de 10^{14} células, das quais 10% aproximadamente são células mamíferas. O restante são microrganismos que compreendem a microbiota residente do hospedeiro. Esta microbiota contribui direta e indiretamente como o desenvolvimento normal da fisiologia, nutrição e sistemas de defesa do hospedeiro.

A colonização microbiana de todas as superfícies corporais expostas ao ambiente começa no nascimento. Essas superfícies estão expostas a uma grande diversidade de microrganismos derivados do ambiente e de outras pessoas. Entretanto, cada superfície, em virtude de suas propriedades físicas e biológicas, é adequada para a colonização somente por um pequeno número desses microrganismos. A cavidade bucal possuiu uma microbiota indígena com composição característica, e que na maior parte do tempo tem relação harmoniosa com o hospedeiro. Esta relação pode ser alterada, talvez com uma maior frequência do que em outras partes do corpo, e conseqüentemente uma doença pode ocorrer na boca.

De todos os sítios do corpo humano, a cavidade bucal é aquela que apresenta os maiores níveis e diversidade de microrganismos. As características peculiares da boca são responsáveis por esta diversidade, já que apresenta diferentes tipos de estruturas e tecidos, e pelas variações na disponibilidade de nutrientes, oxigênio, temperatura e ainda pela exposição a fatores de proteção do hospedeiro.

Estima-se que a cavidade bucal de um indivíduo adulto hospede cerca de 700

espécies bacterianas distintas. A maioria dessas espécies são comensais, mas um subgrupo consiste de patógenos oportunistas que podem causar diversas doenças, entre elas a cárie dental (Paster et al 2001).

Os estreptococos grupo mutans são compostos por 7 espécies de estreptococos orais, com características fenotípicas, ecológicas e patogênicas que estão associadas com o desenvolvimento da cárie dental em seres humanos e em animais. (Balakrishnam 2002). As espécies desse grupo que são comumente relacionadas ao desenvolvimento da cárie dental em humanos são *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*.

Streptococcus mutans são considerados os principais agentes etiológicos da cárie dental, e vários dos seus fatores de virulência estão relacionados com o desenvolvimento da doença cárie, entre eles, a acidogenicidade, aciduricidade, a produção de glucanos insolúveis e de proteínas ligantes de glucanos e a produção de bacteriocinas, denominadas mutacinas (WHILEY & BEIGHTON, 1998). Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos, que inibem o crescimento de bactérias genética e ecologicamente relacionadas, o que pode conferir vantagens ecológicas à espécie produtora no biofilme dental. Entretanto algumas mutacinas têm maior espectro de ação.

Uma característica marcante dos *S. mutans* é a alta frequência de produção de mutacinas ou de substâncias semelhantes às mutacinas (bacteriocinas ou moléculas inibitórias não caracterizadas (JACOB *et al.*, 1953; TAGG *et al.*, 1976; GRÖNROOS *et al.*, 1998; KAMIYA *et al.*, 2005a, b). A produção de bacteriocinas pode influenciar na colonização da espécie mais relacionada com o desenvolvimento da cárie dental, por substituição dos microrganismos residentes, ou por impedir a invasão de bactérias exógenas. Alguns estudos apontam que a atividade

antimicrobiana das mutacinas pode estar relacionada com a prevalência de *S. mutans* na saliva, no biofilme e nas lesões de cárie (BALAKRISHNAN *et al.*, 2002; KAMIYA *et al.*, 2005a) A produção de bacteriocinas pode influenciar na estabilidade de determinada espécie em seu nicho ecológico.

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

Baseando-se na modificação pós-tradução, as bacteriocinas de bactérias de gram-+ foram classificadas em dois grupos: Classe I, De bacteriocinas modificadas ou lantibioticos e Classe II, de bacteriocinas não modificadas ou não lantibióticos (KAMIYA *et al* 2005b)

Bactérias bacteriocinogênicas devem apresentar imunidade à sua própria ação antimicrobiana. Este mecanismo de imunidade a um antimicrobiano natural é, especialmente, importante se a bacteriocina produzida não necessitar de um receptor específico para a sua atividade, como é o caso de alguns lantibióticos. Tais lantibióticos formam poros voltagem-dependentes na membrana citoplasmática de células alvos , sendo letais também para as próprias células produtoras.

Baseado em dados encontrados na literatura, a mutacina I induz a formação de poros na membrana de células sensíveis e a mutacina II despolariza o potencial elétrico transmembrana e o gradiente do pH transmembranico e inibe o transporte do amino acido , diminuindo ATP e inibindo as funções enzimáticas essenciais (CHIKINDAS *et al.*, 1995). .

Os estudos da biodiversidade cariogênicas podem ser um campo promissor para a odontologia , principalmente , quando associados aos estudos de virulência e

patogenicidade dos principais agentes etiológicos da carie dental visto que diferentes genótipos , em um mesmo indivíduo , podem variar na expressão das características patogênicas (CAUFIELD, 1997).

3.2 Objetivos

Os objetivos desse trabalho foram:

- determinar os espectros de atividade antimicrobiana de substâncias semelhantes às mutacinas frente às diferentes espécies bacterianas e fúngicas de interesse odontológico e médico;
- e determinar o perfil de resistência de espécies bacterianas de interesse médico frente aos diferentes antibióticos usuais.

4. Materiais e métodos

4.1. Mutacinotipagem e espectro de atividade antimicrobiana contra espécies de interesse médico e odontológico

Foram selecionados 16 fenótipos de *S. mutans*, produtores de substâncias inibitórias de amplo espectro contra estreptococos orais, identificados previamente em isolados de indivíduos cárie-ativos (NAPIMOGA *et al.* 2004; KAMIYA *et al.*, 2005a – FAEP 1158/01) e em isolados de pares mãe-filho (FLÓRIO *et al.*, 2004; KLEIN *et al.*, 2004).

A bacteriocinotipagem (nesse estudo denominado mutacinotipagem), baseia-se no padrão de produção de bacteriocinas frente a um conjunto de cepas indicadoras, bem como no perfil de sensibilidade a diferentes substâncias inibitórias.

A Mutacinotipagem ou método da difusão em ágar foi empregado para a detecção do espectro da atividade antimicrobiana de mutacinas contra 21 cepas indicadoras pertencentes às espécies de interesse médico como: *Staphylococcus aureus* (4), *Staphylococcus epidermidis* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (1), *Streptococcus pyogenes* (3), *Enterococcus faecalis* (4), *E. coli* (1), *Candida* spp. (7). Estas cepas padrões do banco ATCC foram gentilmente doadas pela Fiocruz (RJ) (tabela 1). Foram traçados os perfis de resistência das cepas indicadoras, de interesse médico, frente aos diferentes antimicrobianos, comumente empregados na terapia e profilaxia antibiótica.

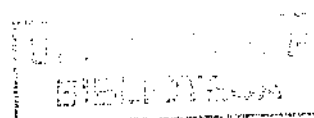
A produção de mutacinas foi testada através do método do antagonismo proposto descrito por KAMIYA *et al.* (2005a), com algumas modificações. Cepas de *S. mutans* congeladas em BHI glicerol (10%) foram reativadas em 5 mL de BHI e incubadas a 37°C, 10% CO₂ por 18h. Após acertar a concentração de células (10⁸ UFC/mL, D.O. $\approx$ 0,1 a 550nm) as respectivas culturas de células produtoras foram inoculadas em TSA a 1,5% (TSA; Difco) através de picadas eqüidistantes. Foram inoculadas 16 cepas produtoras em cada placa, que foi incubada por 48h, nas mesmas condições acima citadas. Após este período, as placas foram cobertas com meio TSA 0,8% (5mL) contendo 0,5 mL (10⁸ UFC/mL, D.O. $\approx$ 0,1 a 550nm) de uma cultura *overnight* em TSB (TSB; Difco) de uma cepa indicadora. Após 24h de incubação, nas mesmas condições, o diâmetro da zona de inibição foi medido em mm. Todos os testes foram realizados em duplicata e a produção de mutacinas foi considerada positiva, quando o diâmetro de inibição apresentou-se maior ou igual a

6 mm para a respectiva cepa indicadora (WU *et al.*, 2004).

Tabela 1. Cepas indicadoras padrões de interesse médico e odontológico:

Espécies de interesse médico (n = 21)	Padrão
<i>Candida albicans</i> * sor. A	ATCC 36801
<i>Candida albicans</i> * sor. B	ATCC 36802
<i>Candida albicans</i>	CBS 562
<i>Candida dubliniensis</i>	CBS 7987
<i>Candida krusei</i>	CBS 573
<i>Candida parapsilosis</i>	CBS 604
<i>Candida tropicalis</i>	CBS 94
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 DR
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12692
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 19095
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 27664
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Streptococcus pyogenes</i> grupo A	ATCC 8668
<i>Streptococcus pyogenes</i> grupo A tipo 1	ATCC 12344
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 10100
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 14506
<i>Enterococcus faecalis</i> CT	ATCC 19433
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25619
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 861
Espécies de interesse odontológico (n = 20)	Padrão
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 3440
<i>Streptococcus mutans</i>	32K
<i>Streptococcus mutans</i>	UA 159
<i>Streptococcus mutans</i>	UA 130
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC 27607
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC 6715
<i>Streptococcus mitis</i>	A
<i>Streptococcus mitis</i>	ATCC 903
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 27975
<i>Streptococcus salivarius</i>	66,4
<i>Streptococcus sanguinis</i>	CR 311
<i>Streptococcus sanguinis</i>	M5
<i>Streptococcus sanguinis</i>	ATCC 10556
<i>Streptococcus sanguinis</i>	ATCC 15300
<i>Streptococcus sanguinis</i>	RP 66
<i>Streptococcus oralis</i>	PB 182
<i>Streptococcus cricetus</i>	HS6
<i>Streptococcus gordonii</i>	CHALIS
<i>Lactobacillus casei</i>	L324M
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	A

Alternativamente, estreptococos orais de interesse odontológico, foram empregados como cepas indicadoras, tais como as cepas padrões da espécie: *S. mutans* (4), *S. sobrinus* (2), *S. sanguinis* (5), *S. mitis* (2), *S. oralis* (1), *S. salivarius* (2), *Lactobacillus* sp (2) e isolados clínicos de *S. mutans* (18). Os resultados poderão



auxiliar na prévia seleção de uma cepa produtora de mutacina com amplo espectro, para futuros estudos visando à purificação e a identificação de uma nova substância antimicrobiana ativa contra patógenos humanos multi-resistentes às drogas usuais e/ou contra espécies principalmente cariogênicas, isoladas da cavidade oral de humanos. Estudos mais detalhados da atividade da substância purificada *in vitro* e *in vivo* poderão viabilizar sua aplicação em futuras terapias antibióticas e/ou em tratamentos preventivos para a cárie dental.

4.2. Perfil de sensibilidade das cepas indicadoras de interesse médico aos antibióticos usuais

Foram traçados os perfis de sensibilidade (ou resistência) de cepas indicadoras (bactérias) de interesse médico, através do método Kirk-Bauer, de difusão, a partir de discos colocados na superfície de agar Muller Hinton. Foram empregados discos de antibióticos, comumente empregados em terapias como: benzil penicilina, ampicilina, amoxacilina, imipinem, vancomicina, azitromicina, estreptocimicina e tetraciclina seguindo-se as normas do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, www.clsi.org). Os discos de antibióticos da marca LABORCLIN tiveram como controles de qualidade as cepas *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Resumidamente, culturas *overnight* das cepas indicadoras de interesse médico, na concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (turbidez 0,5 na escala McFarland ou D.O. = 0,132 a 600 nm), foram inoculadas sobre a superfície do agar Muller Hinton utilizando-se Swab estéril. Após secagem, foram depositados, assepticamente, os discos de antibióticos de forma equidistante, e após 24 horas de incubação nas condições favoráveis para o crescimento de cada cepa, realizou-se a

medição dos respectivos diâmetros dos halos inibitórios, em mm.

Quanto às sensibilidades, as cepas indicadoras foram classificadas como sensíveis (S), moderadamente sensíveis (MS), intermediária (I) ou resistentes (R) de acordo com as normas pré-estabelecidas pelo CLSI.

Segundo o CLSI, o espectro de atividade da penicilina inclui, principalmente, bactérias Gram negativas, Gram positivas e algumas fastidiosas que não produzem β -lactamase. As aminopenicilinas (ampicilina e amoxicilina) são ativas contra espécies Gram negativas adicionais, incluindo alguns membros das *Enterobacteriaceae*. A estrutura dos carbapenems (imipinem) difere ligeiramente da estrutura das penicilinas, sendo que os primeiros são muito mais resistente à hidrólise por β -lactamase, o que lhes dá um amplo espectro de atividade contra muitas bactérias Gram positivas e Gram negativas. A vancomicina é um agente antimicrobiano aceito para tratamento de infecções causadas por bactérias Gram positivas em pacientes alérgicos a penicilina, sendo útil no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram positivas resistentes aos β -lactâmicos, por *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA) e por alguns enterococos.

Já os macrolídeos (eritromicina e azitromicina) são agentes antimicrobianos de amplo espectro contra isolados de bactérias Gram negativas, Gram positivas ou fastidiosas. As drogas neste grupo estão estreitamente relacionadas e, com poucas exceções, só é necessário testar uma das duas, rotineiramente a eritromicina (CLSI). Em adição, os aminoglicosídeos (representados pela estreptomicina) são usados, principalmente, para tratamento de infecções por bastonetes Gram negativos aeróbios ou em combinações sinérgicas com agentes antimicrobianos ativos na parede celular (por exemplo a penicilina, ampicilina e vancomicina) contra algumas bactérias Gram positivas resistentes, como os enterococos.

As tetraciclina inibem a síntese protéica, em nível ribossômico, de certas bactérias Gram positivas e Gram negativas, apresentando amplo espectro de atividade antimicrobiana. Segundo CLSI, as drogas neste grupo estão estreitamente relacionadas e, com poucas exceções, só é necessário testar a tetraciclina de forma rotineira. Os microrganismos sensíveis à tetraciclina também são considerados sensíveis a doxiciclina e minociclina, entretanto, alguns organismos de sensibilidade intermediária ou resistentes à tetraciclina podem ser sensíveis a doxiciclina ou minociclina, ou a ambas.

5. Resultados e Discussão

5.1. Mutacinotipagem e espectro de atividade antimicrobiana contra espécies de interesse médico e odontológico

Os quadros dos anexos 1 e 2 demonstram os espectros inibitórios das 16 cepas produtoras de mutacinas, selecionadas para o estudo, frente a 55 cepas indicadoras de interesse médico-odontológico. Entre parênteses, a porcentagem de sensibilidade de cada cepa indicadora frente as mutacinas produzidas pelos diferentes isolados clínicos de *S. mutans*.

As 16 cepas produtoras selecionadas para o estudo foram divididas em dois grupos: Grupo 1 – com 8 cepas produtoras de mutacinas **não caracterizadas** e de amplo espectro inibitório sobre espécies de interesse médico e odontológico e Grupo 2 – com 6 cepas produtoras de mutacinas **caracterizadas** de amplo espectro inibitório sobre espécies de interesse médico e odontológico e 2 cepas produtoras de mutacinas **não caracterizadas**, porém com espectro inibitório mais direcionado contra bactérias de interesse odontológico, incluindo isolados clínicos.

As cepas produtoras dos grupos 1 e 2 apresentaram amplo espectro de atividade antimicrobiana (halos de 6 a 24 mm de diâmetro) contra a maioria dos isolados clínicos de *S. mutans*, contra colonizadores primários da cavidade oral representadas pelas espécies *Streptococcus sanguinis*, *S. oralis*, *S. salivarius* e *S. mitis*. Algumas cepas demonstraram atividade contra espécies correlacionadas ecologicamente como *Lactobacillus* ssp. e *Candida* ssp. e contra espécies de interesse médico como *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, incluindo cepas resistentes aos antibióticos usuais (item 6.2). As mutacinas não demonstraram atividade contra *Streptococcus gordonii*, *Enterococcus faecalis* e contra bactérias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Também observou-se baixa atividade contra *Candida* ssp e isolados clínicos produtores de mutacinas de amplo espectro.

Quando testada a atividade antimicrobiana das cepas produtoras contra as mesmas, verificou-se a formação de halos inibitórios de 0 a 6 mm de diâmetro. Geralmente, a cepa produtora apresenta auto-imunidade para seu próprio peptídeo antimicrobiano devido a presença de genes de imunidade *mutFEG* no cluster de genes de biossíntese, correspondentes às proteínas MutFEG de membrana capazes de realizar o efluxo do peptídeo (QI *et al.*, 1999a; QI *et al.*, 1999b; QI *et al.*, 2001). De acordo com estes resultados, consideraremos sensibilidade positiva da cepa indicadora à(s) mutacina(s) da respectiva cepa produtora quando o halo inibitório for maior que 6 mm (WU *et al.*, 2004).

As cepas produtoras de mutacinas de amplo espectro (grupos 1 e 2) apresentaram maior resistência cruzada quando comparadas com os demais isolados clínicos de *S. mutans* utilizados no estudo, que foram sensíveis a maioria da(s) substância(s) semelhante(s) à(s) mutacina(s) produzidas. Segundo

KURAMITSU & NAKANO (2006), as proteínas MutFEG de imunidade às mutacinas, presentes em cepas produtoras podem reduzir a sensibilidade das bactérias aos antimicrobianos, através do efluxo inespecífico de múltiplas drogas (MRD). Foi observado que a mutação ou redução da expressão do gene *smbG*, da mutacina Smb, aumentou a sensibilidade da cepa produtora a diferentes agentes antimicrobianos, dentre os quais a penicilina, tetraciclina e triclosan, sugerindo que a sensibilidade das bactérias aos antibióticos pode ser modulada por proteínas de imunidade às bacteriocinas expressas pelo microrganismo produtor.

No presente estudo, pode-se especular o possível papel destas proteínas de imunidade na resistência cruzada observada entre as cepas produtoras, entretanto estudos adicionais como mutagênese sítio dirigida deverão ser realizados para confirmar esta hipótese.

5.2. Perfis de sensibilidade das cepas indicadoras de interesse médico aos antibióticos usuais

A tabela 2 demonstra os perfis de sensibilidades das cepas indicadoras de interesse médico frente diferentes antibióticos. A interpretação dos resultados e a classificação das cepas indicadoras em sensíveis (S), moderadamente sensíveis (MS), intermediária (I) e resistentes (R) aos agentes antimicrobianos baseou-se nas normas do *CLSI*.

Tabela 2. Perfis de sensibilidade das cepas indicadoras de interesse médico frente aos antibióticos usuais, obtidos através de antibiograma (método da difusão em ágar).

	Antibióticos (diâmetro de inibição em mm)							
	Penicilina 10 units	Ampicilina 10 µg	Amoxacilina 10 µg	Imipenem 10 µg	Vancomicina 30 µg	Azitromicina 15 µg	Estreptomicina 10 µg	Tetraciclina 30 µg
<i>S. aureus</i> ATCC 6538DR	R	R	R	S	R	R	R	R
<i>S. aureus</i> ATCC 12692	R	R	R	I	S	R	S	I
<i>S. aureus</i> ATCC 19095	S	S	S	S	I	R	R	R
<i>S. aureus</i> ATCC 27664	S	S	S	S	I	R	R	R
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	R	R	R	S	S	R	R	R
<i>S. pyogenes</i> ATCC 8668	R	S	S	S	S	R	R	S
<i>S. pyogenes</i> ATCC 12344	R	R	R	S	S	R	R	R
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	S	S	S	S	R	R	R	I
<i>E. faecalis</i> ATCC 10100	R	MS	R	I	I	R	R	I
<i>E. faecalis</i> ATCC 14506	R	R	R	S	R	R	R	R
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	R	R	R	S	R	R	R	R
<i>E. faecalis</i> ATCC 24212	R	R	R	S	R	R	R	R
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619	*	I	R	S	R	R	R	R
<i>E. coli</i> ATCC 861	*	R	R	S	R	R	S	S

Sensibilidades segundo CLSI: S = sensível; MS = moderadamente sensível; I = intermediária; R = resistente; * sem nomenclatura.

Todas as cepas indicadoras foram sensíveis ao imipenem, entretanto a maioria apresentou resistência total ou intermediária aos antimicrobianos usuais. Muitas destas cepas, resistentes aos antibióticos usuais, foram inibidas por substâncias semelhantes às mutacinas, de isolados clínicos de *S. mutans*, o que enfatiza a importância da identificação destes antimicrobianos com possível aplicabilidade biotecnológica.

6. Conclusão

Diante do exposto, conclui-se que as mutacinas podem representar vantagens ecológicas e podem ser importantes candidatos para futuras aplicabilidades nas áreas médicas e biotecnológicas.

7. Anexos

Anexo 1. Quadro das percentagens (%) de sensibilidade das cepas indicadoras frente às mutacinas produzidas por isolados clínicos de *S. mutans* do grupo 1:

Cepas Produtoras <i>S. mutans</i> n = 8	<i>S. mutans</i> CCT 3440	<i>S. mutans</i> 32K	<i>S. sobrinus</i> ATCC 27607	<i>S. sobrinus</i> 6715	<i>S. mitis</i> A	<i>S. mitis</i> ATCC 903	<i>S. salivarius</i> ATCC 27975	<i>S. salivarius</i> 66.4	<i>S. sanguinis</i> CR 311	<i>S. sanguinis</i> M5	<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	<i>S. oralis</i> PB182	<i>S. cricetus</i> HS6	<i>S. mutans</i> UA159	<i>S. sobrinus</i> 15JP2
1.M18(2)2	28,57	50	57,14	0	14,28	100	0	0	57,14	57,14	14,28	100	28,57	28,57	28,57
2. M7/4	0	0	27,27	0	18,18	63,63	27,27	27,27	0	18,18	0	100	0	45,45	45,45
3.M18(2)16	0	7,14	0	0	0	100	0	0	42,85	57,14	21,42	71,42	14,28	14,28	14,28
4. C8/P7	0	0	0	0	50	28,57	0	57,14	28,57	0	0	28,57	0	42,85	0
5. C8/S12	0	0	0	0	50	28,57	0	57,14	28,57	0	0	28,57	0	42,85	4
6. C2P2	0	0	0	0	42,85	57,14	57,14	42,85	14,28	57,14	28,57	57,14	0	57,14	28,57
7. C2/S3	14,28	0	0	0	57,14	57,14	71,42	57,14	14,28	57,14	28,57	57,14	0	57,14	42,85
8. C2/S12	28,57	0	0	0	57,14	57,14	71,42	42,85	14,28	57,14	28,57	57,14	0	57,14	57,14
Cepas Produtoras <i>S. mutans</i> n = 8	<i>S. mutans</i> UA130	<i>S. mutans</i> 55T1	<i>S. mutans</i> C2(6)21	<i>S. mutans</i> C3(8)2	<i>S. mutans</i> C4(7)5	<i>S. mutans</i> C5(5)6	<i>S. mutans</i> C8(6)1	<i>S. mutans</i> C13(4)3	<i>S. mutans</i> C2(4)2	<i>S. mutans</i> C3(5)1	<i>S. mutans</i> C7(9)16	<i>S. mutans</i> C8(4)1	<i>S. mutans</i> C10(8)4	<i>S. mutans</i> C18(4)3	<i>S. mutans</i> C28(5)8
1. M18(2)2	28,57	0	0	28,57	42,85	57,14	28,57	42,85	0	42,85	71,42	42,85	42,85	85,71	42,85
2. M7/4	63,63	45,45	9,09	54,54	63,63	54,54	59,09	45,45	0	54,54	9,09	45,45	45,45	72,72	45,45
3.M18(2)16	0	7,14	0	0	0	57,14	0	0	14,28	57,14	0	71,42	0	14,28	14,28
4. C8/P7	42,85	0	0	28,57	0	0	42,85	42,85	0	42,85	0	28,57	14,28	42,85	14,28
5. C8/S12	42,85	0	0	28,57	0	0	42,85	42,85	0	42,85	0	28,57	14,28	42,85	28,57
6. C2P2	71,42	0	57,14	14,28	0	14,28	28,57	28,57	28,57	28,57	14,28	14,28	28,57	42,85	28,57
7. C2/S3	71,42	0	57,14	28,57	0	14,28	42,85	28,57	28,57	42,85	14,28	28,57	28,57	42,85	28,57
8 C2/S12	71,42	0	57,14	42,85	0	28,57	28,57	28,57	28,57	28,57	14,28	14,28	28,57	50	28,57
Cepas Produtoras <i>S. mutans</i> n = 8	<i>E. faecalis</i> ATCC 10100	<i>S. pyogenes</i> ATCC 8668	<i>S. pyogenes</i> ATCC 12344	<i>S. aureus</i> ATCC 12692	<i>S. aureus</i> ATCC 19095	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619	<i>E. faecalis</i> ATCC 14506	<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	<i>S. aureus</i> ATCC 6538DR	<i>S. aureus</i> ATCC 27664	<i>S. sanguinis</i> ATCC 15300	<i>E. coli</i> NTCC 861	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	<i>S. pyogenes</i> ATCC 12344
1 M18(2)2	0	78,57	0	57,14	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	100
2. M7/4	0	27,27	0	45,45	45,45	36,36	0	0	0	36,36	36,36	63,63	0	100	100
3.M18(2)16	0	42,85	0	57,14	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	100
4. C8/P7	0	42,85	0	42,85	57,14	57,14	0	0	0	42,85	42,85	100	0	100	100
5. C8/S12	0	28,57	0	57,14	57,14	57,14	0	0	0	42,85	42,85	100	0	100	100
6. C2P2	0	14,28	0	42,85	42,85	57,14	0	0	0	42,85	42,85	100	0	100	100
7. C2/S3	0	14,28	0	71,42	28,57	57,14	0	0	0	57,14	57,14	100	0	100	100
8. C2/S12	0	14,28	0	71,42	28,57	57,14	0	0	0	57,14	28,57	100	0	100	100
Cepas Produtoras <i>S. mutans</i> n = 8	<i>C. albicans</i> ATCC 36801	<i>C. albicans</i> ATCC 36802	<i>C. albicans</i> CBS 562	<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	<i>C. krusei</i> CBS 573	<i>C. parapsilosis</i> CBS 604	<i>C. tropicalis</i> CBS 94	<i>L. acidophilus</i> A	<i>L. casei</i> L324M	<i>S. sanguinis</i> RP 66	<i>S. gordonii</i> challis				
1. M18(2)2	0	0	0	0	0	0	0	0	28,57	28,57	0				
2. M7/4	0	0	18,18	0	0	0	0	0	0	18,18	0				
3. 18(2)16	0	0	0	0	0	0	0	0	28,57	14,28	0				
4. C8/P7	0	0	0	0	0	0	14,28	14,28	28,57	28,57	0				
5. C8/S12	0	0	0	0	0	0	14,28	0	42,85	28,57	0				
6. C2P2	0	0	0	0	0	0	0	14,28	14,28	28,57	0				
7. C2/S3	0	0	0	14,28	0	14,28	14,28	28,57	28,57	28,57	0				
8 C2/S12	0	0	0	14,28	0	14,28	14,28	28,57	28,57	28,57	0				

Anexo 2. Quadro das porcentagens (%) de sensibilidade das cepas indicadoras frente às mutacinas produzidas por isolados clínicos de *S. mutans* do grupo 2:

Cepas Produtoras <i>S. mutans</i> n = 8	<i>S. mutans</i> CCT 3440	<i>S. mutans</i> 32K	<i>S. sobrinus</i> ATCC 27607	<i>S. sobrinus</i> 6715	<i>S. mitis</i> A	<i>S. mitis</i> ATCC 903	<i>S. salivarius</i> ATCC 27975	<i>S. salivarius</i> 66.4	<i>S. sanguinis</i> CR 311	<i>S. sanguinis</i> M5	<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	<i>S. oralis</i> PB182	<i>S. cricetus</i> HS6	<i>S. mutans</i> UA159	<i>S. sobrinus</i> 15JP2
1.C18(4)2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2. C5/S12	30	50	40	0	20	80	20	20	20	60	20	100	40	50	50
3. C8/D7	12,5	18,75	0	12,5	12,5	100	12,5	0	50	62,5	31,25	75	25	25	25
4.C8/D10	37,5	25	12,5	0	56,25	62,5	0	62,5	37,5	12,5	12,5	25	25	50	18,75
5. C9/S14	25	12,5	12,5	0	37,5	50	0	56,25	25	37,5	6,25	18,75	6,25	37,5	50
6. C9/D3	37,5	25	12,5	0	56,25	62,5	62,5	0	37,5	50	37,5	87,5	25	37,5	62,5
7. C7(5)1	0	0	0	43,75	12,5	100	12,5	18,75	93,75	56,25	0	25	0	0	0
8. C2/S4	25	12,5	12,5	12,5	62,5	62,5	75	50	25	62,5	37,5	62,5	12,5	37,5	18,75
Cepas Produtoras <i>S. mutans</i> n = 8	<i>S. mutans</i> UA130	<i>S. mutans</i> 5ST1	<i>S. mutans</i> C2(6)21	<i>S. mutans</i> C3(8)2	<i>S. mutans</i> C4(7)5	<i>S. mutans</i> C5(5)6	<i>S. mutans</i> C8(6)1	<i>S. mutans</i> C13(4)3	<i>S. mutans</i> C2(4)2	<i>S. mutans</i> C3(5)1	<i>S. mutans</i> C7(9)16	<i>S. mutans</i> C8(4)1	<i>S. mutans</i> C10(8)4	<i>S. mutans</i> C18(4)3	<i>S. mutans</i> C28(5)8
1.C18(4)2	42,85	14,28	0	42,85	57,14	71,42	42,85	57,14	7,14	57,14	85,71	57,14	57,14	100	57,14
2. C5/S12	50	5	40	30	0	20	30	30	30	30	20	20	30	35	30
3. C8/D7	12,5	18,75	0	0	6,25	62,5	6,25	6,25	25	62,5	12,5	75	12,5	25	25
4.C8/D10	50	0	0	50	25	0	50	37,5	0	50	37,5	37,5	0	37,5	37,5
5. C9/S14	50	0	50	12,5	0	0	50	37,5	37,5	37,5	25	25	37,5	62,5	25
6. C9/D3	62,5	0	62,5	6,25	12,5	12,5	37,5	25	37,5	25	12,5	37,5	37,5	50	25
7. C7(5)1	0	0	18,75	12,5	0	12,5	0	0	0	0	12,5	0	0	62,5	0
8. C2/S4	50	0	0	12,5	25	0	37,5	37,5	0	50	25	37,5	0	37,5	37,5
Cepas Produtoras <i>S. mutans</i> n = 8	<i>E. faecalis</i> ATCC 10100	<i>S. pyogenes</i> ATCC 9668	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>S. aureus</i> ATCC 12892	<i>S. aureus</i> ATCC 19095	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619	<i>E. faecalis</i> ATCC 14506	<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	<i>S. aureus</i> ATCC 6538DR	<i>S. aureus</i> ATCC 27664	<i>S. sanguinis</i> ATCC 15300	<i>E. coli</i> NTCC 861	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	<i>S. pyogenes</i> ATCC 12344
1.C18(4)2	0	28,57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100
2. C5/S12	0	20	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100
3. C8/D7	12,5	50	0	62,5	62,5	62,5	0	0	0	50	62,5	100	0	100	100
4.C8/D10	0	62,5	6,25	37,5	62,5	50	0	0	0	37,5	37,5	100	0	100	100
5. C9/S14	6,25	62,5	6,25	62,5	62,5	62,5	0	0	0	50	62,5	100	0	100	100
6. C9/D3	0	37,5	6,25	62,5	62,5	50	0	0	0	50	62,5	100	0	100	100
7. C7(5)1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	100
8. C2/S4	25	50	0	62,5	62,5	62,5	0	0	0	62,5	50	100	0	100	100
Cepas Produtoras <i>S. mutans</i> n = 8	<i>C. albicans</i> ATCC 36801	<i>C. albicans</i> ATCC 36802	<i>C. albicans</i> CBS 562	<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	<i>C. krusei</i> CBS 573	<i>C. parapsilosis</i> CBS 604	<i>C. tropicalis</i> CBS 94	<i>L. acidophilus</i> A	<i>L. casei</i> L324M	<i>S. sanguinis</i> RP 66	<i>S. gordonii</i> chalis	Mutacina I	Mutacina II	Mutacina III	Mutacina IV
1.C18(4)2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
2. C5/S12	0	0	0	0	0	0	0	0	30	5	0	-	-	-	-
3. C8/D7	0	0	25	12,5	12,5	12,5	12,5	37,5	12,5	37,5	0	-	-	+	-
4.C8/D10	0	0	0	12,5	0	0	12,5	37,5	12,5	37,5	0	-	-	+	-
5. C9/S14	0	0	12,5	12,5	12,5	25	25	50	25	50	0	-	-	+	-
6. C9/D3	0	0	0	12,5	0	12,5	12,5	37,5	25	37,5	0	-	-	+	-
7. C7(5)1	0	0	0	0	0	0	0	0	37,5	37,5	0	+	+	-	-
8. C2/S4	0	0	0	12,5	0	12,5	12,5	25	12,5	37,5	0	-	-	+	-

Referências

1. BALAKRISHNAN, M; SIMMONDS, R.S.; KILIAN, M. Different bacteriocin activities of *S. mutans* reflect distinct phylogenetic lineages. J MED MICROBIOL, Edinburgh and Livingstone, v.51, n.11, p.941-948, Nov 2002
2. BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-24, 1976.
3. CHIKINDAS ML, NÓVAK J, DRIESSEN AJM, KONINGS WN, SCHILLING KM, CAUFIELD P. Mutacin II, a bacterial lantibiotic from *S. mutans*. Antimic. Agent. Chemoth. 39: 2656-2660, 1995.
4. JACOB F, LWOFF A, SIMINOVITCH A, WOLLMAN E. Definition de quelques termes relatifs a la lysogénie. Ann. Inst. Pasteur 84: 222-224, 1953.
5. KAMIYA RU, NAPIMOGA MH, ROSA RT, HÖFLING JF, GONÇALVES RB. Mutacins production in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-affected and caries-free individuals. Oral Microbiol. Immunol. 20: 20-24, 2005a.
6. KAMIYA RU, NAPIMOGA MH, HÖFLING JF, GONÇALVES RB. Frequency of four different mutacin biosynthesis genes in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-free and caries-active individuals. J Med Microbiol. 54: 599-604, 2005b.
7. Paster, B. J., S. K. Boches, J. L. Galvin, R. E. Ericson, C. N. Lau, V. A. Levanos, A. Sahasrabudhe, and F Dewhirst. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J.Bacteriol. 183:3770-3783.
8. QI, F, CHEN P, CAUFIELD PW. Purification of mutacin III from group III *S. mutans* UA787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3880-3887, 1999.
9. QI F, MERRIT J, LUX R & SHI W. Inactivation of the *ciaH* gene in *S. mutans* diminishes mutacin production and competence development, alters sucrose-dependent biofilm formation, and reduces stress tolerance. Infect Immun 72: 4895-4899, 2004.
10. WHILEY RA, BEIGHTON D. Current classification of the oral streptococci. Oral Microbiol Immunol 13: 195-216, 1998.
11. WU CW, YIN LJ, JIANG ST. Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. Journal of Agricult. and Food Chemist. 52: 1146-1151, 2004.

