



ANEXO 2

**CONCORDÂNCIA DO ORIENTADOR**

Declaro que o (a) aluno (a) Mariana da Fonseca RA 094956  
esteve sob minha orientação para a realização do Trabalho de Conclusão de Curso  
intitulado Análise da colonização bucal de crianças no ano de 2012  
com 2 a 16 meses de idade por espécies não hemolíticas do gênero Streptococcus.  
Concordo com a submissão do trabalho apresentado à Comissão de  
Graduação pelo aluno, como requisito para aprovação na disciplina DS833 - Trabalho de  
Conclusão de Curso.

Piracicaba, 29 de setembro de 2012

(nome e assinatura do orientador)

Prof. Dra. Renata O. Matos Graner  
Área de Microbiologia e Imunologia  
FOP-UNICAMP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Análise da colonização bucal de crianças com 2 a 16  
meses de idade por espécies não hemolíticas do gênero  
*Streptococcus*.

*Analysis of oral colonization by non-hemolytic species of the genus Streptococcus in  
children of 2 to 16 months of age.*

Autora: Mariana da Fonseca

Piracicaba, 2012.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Autora: Mariana da Fonseca

Análise da colonização bucal de crianças com 2 a 16  
meses de idade por espécies não hemolíticas do gênero  
*Streptococcus*.

*Analysis of oral colonization by non-hemolytic species of the genus Streptococcus in  
children of 2 to 16 months of age.*

Orientadora: Renata de Oliveira Mattos-Graner

Co-orientador: Rafael Nóbrega Stipp

Piracicaba, 2012.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

F733a Fonseca, Mariana da, 1989-  
Análise da colonização bucal de crianças com 2 a 16 meses de idade por espécies não hemolíticas do gênero Streptococcus / Mariana da Fonseca. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Renata de Oliveira Mattos-Graner.  
Coorientador: Rafael Nobrega Stipp.  
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –  
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba.

1. Taxonomia. 2. Microbiota (Medicina). I. Mattos-  
Graner, Renata de Oliveira, 1971- II. Stipp, Rafael  
Nobrega. III. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

## **RESUMO.**

A cavidade bucal apresenta alta diversidade de microrganismos, os quais podem ser patogênicos sob condições específicas. Os microrganismos bucais pioneiros que se estabelecem na infância podem ter grande influência na determinação da composição da microbiota bucal individual e na maturação do sistema imunológico de mucosas. Embora haja dados indicando que *Streptococcus ssp.* são predominantes nos diversos nichos bucais em adultos, ainda são poucos os estudos que caracterizam a colonização inicial da boca por diferentes espécies e/ou grupos taxonômicos deste gênero bacteriano. O objetivo deste projeto consistiu em caracterizar a colonização bucal de infantes por espécies de *Streptococcus* não-hemolíticos relevantes dos grupos Mitis, Sanguinis, Salivarius, Anginosus e Mutans, durante as fases iniciais de estabelecimento da microbiota. Para isto, amostras de saliva de crianças saudáveis com 2 a 16 meses de idade foram coletadas e estimados os níveis de *Streptococcus ssp.* em relação ao total de microrganismos cultiváveis. Diferentes tipos morfológicos foram isolados e classificados através de reações de PCR com primers espécie- e/ou grupo-específicos. A prevalência, a variabilidade e a proporção dos diferentes grupos de *Streptococcus* não-hemolíticos foram determinadas para as diferentes faixas etárias estudadas. Das amostras identificadas, a grande maioria pertence à espécie *S. salivarius* (35%), dominante em todas as faixas etárias, seguida de *S. mitis* (5%), *S. oralis* (2%) e *S. sanguinis* (1%). Estreptococos consistiram na grande maioria da microbiota cultivável nas faixas etárias estudadas (83% a 100%). Um grande número de cepas (n=195, 49%) não pôde ser identificado em espécies ou grupos usando-se o sistema de PCR, mostrando uma limitação do sistema de identificação proposto. Portanto, sistemas moleculares mais eficazes de identificação de estreptococos não-hemolíticos precisam ser desenvolvidos para melhor caracterizar o desenvolvimento da microbiota bucal comensal de crianças.

Palavras-chave: Taxonomia, *Streptococcus*, colonização, microbiota, infantes.

## **ABSTRACT.**

The human oral cavity is a complex ecosystem that contains a large number of bacterial colonizers. Pioneers species colonizing childhood may account to both composition of the oral microbiota and to individual maturation of mucosal immune system. Although there are data indicating that *Streptococcus* ssp. are prevalent in different niches of the mouth in adults, there are few studies that characterize the initial colonization of the mouth by different species or taxonomic groups of this bacterial genus. Thus, the aim of this project was to characterize the colonization of non-hemolytic *Streptococcus* species (groups Mitis, Sanguinis, Salivarius, Mutans and Anginosus), in infants during the early stages of establishment of the oral microbiota. To this end, saliva samples from healthy, 2-16 months old children were collected. Levels of *Streptococcus* ssp. and total cultivable microorganisms were estimated by culturing and counting. *Streptococcus* ssp. from different morphological colonies types were isolated and identified using PCR with species or group-specific primers. The prevalence, variability and proportion of species and groups were determined by age. Results: Streptococci consisted of the vast majority of cultivable microbiota in age groups (83% to 100%). From the samples were identification was archived, the major species was *S. salivarius* (35%), dominant in all age groups, followed by *S. mitis* (5%), *S. oralis* (2%) and *S. sanguinis* (1%). A large number of strains (n=195, 49%) could not be identified in species or groups using the identification by PCR, showing a limitation of the proposed methodology. A more effective system for identification of non-haemolytic streptococci has to be developed to better characterize the development of the oral commensal microbiota of children.

Keywords: Taxonomy, *Streptococcus*, colonization, microbiota, infants.

## SUMÁRIO

Documento de concordância do orientador.....	1
Capa.....	2
Folha de Rosto.....	3
Ficha Catalográfica.....	4
Resumo e Palavras-chave.....	5
<i>Abstract e Keywords</i> .....	6
Sumário.....	7
1. Introdução e Revisão de Literatura.....	8
2. Proposição.....	12
3. Material e Métodos.....	13
4. Resultados.....	18
5. Discussão.....	32
6. Conclusões.....	34
7. Referências Bibliográficas.....	35
Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	39
Cópia do Parecer de aprovação do relatório final de Iniciação Científica pelos assessores <i>ad hoc</i> da FAPESP ou CNPq.....	40

## **1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.**

### **1.1 A microbiota bucal.**

A cavidade bucal representa uma das superfícies do corpo com maior quantidade e diversidade de microrganismos (1, 17, 18). Os dentes representam os principais nichos ecológicos responsáveis por esta diversidade, uma vez que são colonizados por comunidades microbianas em múltiplas camadas altamente complexas, os biofilmes dentários, também referidos como placa dental (17, 18). Estima-se que a cavidade bucal de adultos possa abrigar cerca de 700 espécies bacterianas ou filotipos (1, 23). As principais doenças infecciosas da boca, como a cárie e a doença periodontal, são causadas por desequilíbrios ecológicos de comunidades da placa dental que resultam na emergência de patógenos oportunistas. Assim, a proporção de microrganismos com potencial patogênico em relação aos microrganismos comensais varia significativamente quando biofilmes de pessoas saudáveis são comparados com biofilmes de pessoas acometidas por diferentes doenças bucais (18, 17). A persistência dos processos infecciosos tem sido ainda associada à indução de um processo inflamatório crônico sistêmico o qual promove e/ou colabora para o desenvolvimento de diversas doenças em pessoas saudáveis ou com sistema imunológico debilitado, incluindo-se endocardite bacteriana, aterosclerose, pneumonia, parto prematuro e diabetes (8, 11, 12).

Há diversas evidências de que os principais patógenos bucais são adquiridos precocemente na infância durante as fases iniciais de colonização bucal, entretanto, há poucos estudos avaliando a composição e diversidade de espécies comensais durante as fases iniciais de estabelecimento da microbiota bucal. Espécies microbianas comumente identificadas na microbiota normal de pessoas saudáveis apresentam diversos mecanismos de competição com patógenos oportunistas da cárie dentária ou da doença periodontal (5, 6, 10, 15, 16). Além disto, os microrganismos comensais da boca parecem ter papel importante na determinação do padrão de resposta imunológica durante as fases iniciais de colonização bucal (27), o que pode ter influências significativas na susceptibilidade individual às infecções por espécies patogênicas (19-21). Entretanto, há poucos estudos avaliando a história natural de colonização bucal por diferentes espécies comensais

durante as fases iniciais de estabelecimento da microbiota bucal, uma vez que a maiorias estudos se concentra em espécies patogênicas (3, 11).

Projetos de seqüenciamento do genoma de algumas das espécies bacterianas comensais da boca foram iniciados mais recentemente e devem contribuir para o estudo sobre identificação e compreensão de fatores de colonização por estes microrganismos (14). O seqüenciamento do genoma de cepas das espécies do gênero *Streptococcus* referidos como do grupo viridans, classicamente detectadas na cavidade bucal incluem os estudos para determinação dos genomas das cepas *Streptococcus sanguinis* SK36, *Streptococcus mitis* NTCT12261 e *Streptococcus gordonii* Challis substr. CH1 (1, 7). Estas espécies podem colonizar também outros sítios com alta carga microbiana, como o trato gastrointestinal (22), e trato respiratório superior (4), o que reforça o papel importante de bactérias do gênero *Streptococcus* no equilíbrio da microbiota normal de humanos.

São poucos os estudos do padrão de colonização inicial da boca por diferentes espécies de estreptococos viridans, em parte por causa da dificuldade para a identificação fenotípica e genética destas espécies (8, 14). Estratégias moleculares de identificação têm sido sugeridas para facilitar este processo (14).

## **1.2 Espécies do gênero *Streptococcus* como pioneiros da microbiota bucal normal.**

A despeito da alta diversidade microbiana da cavidade bucal (1), grandes variações individuais são observadas entre pessoas (1), o que é modulado por um vasto número de variáveis ambientais (por exemplo, dieta e fontes de transmissão), do hospedeiro (por exemplo, *status* imunológico) e microbianas (por exemplo, diversidade fenotípica associada a diferenças na virulência e/ou capacidade de colonização). Na maioria das pessoas, bactérias do gênero *Streptococcus* parecem ser pioneiras nos diversos nichos ecológicos da boca, incluindo-se superfícies mucosas e superfícies dentárias (1, 7), as quais permanecem predominantes na microbiota de adultos tanto em superfícies mucosas como nos biofilmes dentários (1, 7). Análises independentes de cultivo indicam que *Streptococcus spp.* representam de 60 a 80% do total de microrganismos que compõem o biofilme dental durante as

primeiras 8h de formação em adultos, sendo que estes microrganismos ainda predominam durante as primeiras 24 horas de formação de biofilmes (7). Espécies de *Streptococcus* dispõem de diversos componentes de superfície para colonização dos dentes e fornecem novos ligantes para receptores de outras espécies microbianas. Além disto, as espécies pioneiras modificam as condições ecológicas da microbiota local, viabilizando a colonização por outros gêneros e espécies (7).

*Streptococcus spp.* estimulam a maturação do sistema imune de mucosas adaptativo da mucosa bucal (24-28). Algumas semanas após o nascimento, são detectados anticorpos IgA salivares reativos contra vários antígenos de espécies colonizadoras como *S. mitis* (25). A diversidade da especificidade anticorpos salivares aumenta significativamente com a erupção dos dentes, por volta dos seis meses de idade. Entre os 6 e 12 meses de idade, são detectados mais freqüentemente anticorpos contra a espécie *Streptococcus mutans*, principal patógeno da cárie (20, 24). O padrão de especificidade de anticorpos IgA salivares observados aos 6 meses de idade influencia na susceptibilidade à colonização por *S. mutans* (20). Assim, é possível que a resposta imunológica induzida pelos colonizadores pioneiros promova o desenvolvimento de uma resposta imunológica protetora contra a cárie (19-21).

### **1.3 Classificação taxonômica dos estreptococos bucais.**

O gênero *Streptococcus* inclui mais de 50 espécies, cuja maioria é incluída em um dos seis grupos filogenéticos determinados em análises comparativas das seqüências do gene 16SrRNA (8, 13). Além do grupo piogênico, o qual inclui espécies patogênicas betahemolíticas, cinco grupos incluem diversas espécies comensais do trato respiratório superior e boca alfa- ou gama-hemolíticas.

O grupo viridans inclui espécies cujas cepas produzem alfa-hemólise em agar sangue, o que deu origem ao nome viridans (de verde), embora atualmente se saiba que muitas espécies ou cepas do grupo viridans sejam gama-hemolíticas. Neste projeto, vamos nos referir aos *Streptococcus* alfa e gama-hemolíticos como não-hemolíticos. Atualmente o grupo viridans inclui cinco grupos: 1) Mutans, 2) Salivarius, 3) Anginosus, 4) Sanguinis e 5) Mitis (8).

O grupo mutans, com 8 espécies, inclui *S. mutans*, o principal patógeno da cárie detectado exclusivamente em humanos. O grupo Salivarius compreende seis espécies principais, sendo detectadas em humanos as espécies *S. salivarius*, *S. vestibularis* e *S. infantarius*. O grupo Anginosus inclui 3 espécies de humanos (*S. anginosus*, *S. constellatus* e *S. intermedius*) e o grupo Sanguinis compreende três espécies, *S. sanguinis*, *S. gordonii* e *S. parasanguinis*, todas detectadas exclusivamente em humanos. O grupo Mitis é o com maior complexidade taxonômica, tendo sofrido diversas modificações nos últimos anos (8).

Análises filogenéticas dos genes 16SrRNA indicam 12 espécies distintas neste grupo, entre elas as espécies consideradas comensais em humanos *S. mitis*, *S. oralis*, *S. cristatus* e *S. infantis*. Este grupo também inclui a espécie patogênica *S. pneumoniae* (13,14) e comparações dos genomas da cepa *S. mitis* NTCT12261 com o genoma de cepas de *S. pneumoniae*, revelam conservação de diversos fatores de virulência incluindo-se IgA1- proteases, pneumolisinas e autolisinas, indicando um grupo de maior similaridade dentro grupo Mitis formado pelas espécies *S. mitis*, *S. pneumoniae* e *S. pseudopneumoniae* (14).

A similaridade genética entre espécies do grupo Viridans torna difícil a identificação destas espécies, através de sistemas de caracterização fenotípica ou molecular (8). Diversas espécies do grupo Mitis são detectadas como colonizadoras pioneiras dos dentes e mucosa bucal (7, 16, 25) e a influência destas espécies na posterior colonização por espécies patogênicas precisa ser mais estudada (5, 6, 10).

Não há estudos que identifiquem diversas espécies destes grupos em crianças durante as fases iniciais de colonização bucal. Estes estudos são importantes para a compreensão da importância destes microrganismos no estabelecimento de uma microbiota comensal e poderão contribuir com informações relevantes para a análise sobre a susceptibilidade individual à colonização por espécies patogênicas e sobre o processo de maturação da resposta imunológica adaptativa.

## **2. PROPOSIÇÕES.**

O objetivo geral deste projeto consistiu em caracterizar a colonização bucal de crianças por espécies de *Streptococcus* não-hemolíticos relevantes dos grupos Mitis, Sanguinis, Salivarius, Anginosus e Mutans, durante as fases iniciais de colonização bucal. Para isto, este projeto teve os seguintes objetivos específicos:

1) Verificar a proporção de *Streptococcus* não-hemolíticos em amostras de saliva de crianças de 2 a 16 meses de idade em relação ao total de microrganismos cultiváveis.

2) Isolar cepas de *Streptococcus* não-hemolíticos representativas das espécies ou grupos taxonômicos detectados nas crianças estudadas.

3) Classificar cepas representativas de *Streptococcus* não-hemolíticos entre os grupos Mutans, Mitis, Sanguinis, Salivarius e Anginosus, utilizando-se de métodos de caracterização genética.

4) Investigar variações na prevalência de cada grupo taxonômico nas diferentes faixas etárias da população estudada nas amostras bucais.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS.**

#### **3.1 População estudada e delineamento de estudo.**

Foram incluídas no estudo um total de 33 crianças com 2 meses a 16 meses de idade, sendo 5 faixas etárias: (1) 2 a 4 meses, (2) 5 a 7 meses, (3) 8 a 10, (4) 11 a 13, (5) 14 a 16 meses. Foram coletadas amostras de 33 crianças, sendo 6 de 2 a 4 meses, 6 de 5 a 7, 8 de 8 a 10, 7 de 11 a 13 e 6 de 14 a 16 meses. Esta faixa etária foi selecionada por ser o período de desenvolvimento de microbiota comensal, o que se reflete na maturação da resposta imunológica adaptativa (19, 20). Estudos prévios indicam que por volta dos 6 a 12 meses de idade, a maioria das crianças de população de baixa renda de Piracicaba- SP apresentam padrões altamente complexos de resposta de anticorpos IgA salivares contra *Streptococcus mitis* e *Streptococcus mutans* (20), e que estes padrões se estabilizam a partir dos 12 meses de idade (19, 20).

As crianças envolvidas no estudo foram as que procuraram atendimento no Centro de Pesquisa e Atendimento Odontológico para Pacientes Especiais (cepae) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP. Para participar da pesquisa, o estudo foi explicado para as mães ou responsáveis em reuniões realizadas durante o cronograma de atividades do cepae. Após isto, as mães autorizaram a participação de seus filhos em entrevistas individuais, nas quais assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/UNICAMP. A utilização de antibióticos em até um mês antes do exame e problemas de saúde sistêmicos ou bucais foram adotados como critério de exclusão.

#### **3.2 Coletas das amostras microbiológicas e isolamento das cepas de estreptococos.**

As coletas foram realizadas anteriormente ao atendimento odontológico e o histórico alimentar prévio foi registrado. As amostras bucais foram coletadas com *swabs* estéreis, os quais foram umedecidos em saliva e levemente esfregados nos sulcos gengivais vestibulares superiores e inferiores, palato duro, assoalho bucal, dorso da língua e bochechas, sendo imediatamente submersos em 1 ml de água

peptonada estéril gelada em microtubos. As amostras foram mantidas em gelo e imediatamente processadas no Laboratório de Microbiologia (FOP-UNICAMP), em período não superior a 30 minutos.

Para o cultivo dos isolados, diluições seriadas das amostras, previamente homogeneizadas vigorosamente em vortex durante 1 min., foram submetidas à diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-11}$ ). De cada diluição, três gotas, contendo 25ul cada (Westergren & Krasse, 1978), foram inoculadas em placas de Petri contendo meio BHI agar com 5% de sangue desfibrinado de carneiro (AS) e *Mitis salivarius agar* (MSA) (Difco). As placas foram incubadas a 37°C em estufa a 10% CO<sub>2</sub> durante 48h. A contagem de microrganismos totais e de estreptococos foi realizada respectivamente nas placas de AS e MSA, com auxílio de microscópio estereoscópico, nas placas cuja diluição tenha gerado cerca de 30 a 300 UFC. Através de cálculos de regressão, estimou-se o número de UFC por mililitro de saliva e os valores expressos em Log base 10.

O isolamento de cepas representativas de estreptococos foi realizado através da coleta de colônias individuais. Para tanto, utilizamos placas-cultivo paralelas, que receberam 50ul das mesmas diluições, porém semeados com auxílio de alça Drigalsky. Por criança, três unidades de cada tipo colonial observado foram selecionadas, semeadas por esgotamento em novo meio e incubadas (37°C/10%CO<sub>2</sub>/24-48h). A pureza das culturas foi avaliada com auxílio de lupa estereoscópica e coloração de Gram. As culturas puras foram estocadas a -70°C, em *skim milk* a 10%.

### **3.3 Identificação dos isolados.**

#### **3.3.1 Análises fenotípicas.**

Durante os procedimentos de isolamento, foram anotadas informações sobre as características coloniais e fotos digitais das morfologias encontradas obtidas com auxílio de máquina digital Nikon, sob aumento de 20 a 40 vezes. Foram anotados os números de colônias crescidas de cada tipo morfológico encontrado. Com base em nossa experiência com espécies do grupo Mutans, a análise da morfologia colonial foi importante para diferenciação das cepas deste grupo.

### 3.3.2 Análises genéticas.

#### 4.3.2.1 Extração de DNA genômico.

As células utilizadas para extração de DNA foram obtidas de culturas obtidas a partir dos estoques congelados. Para isto, 10µl de suspensão estoque em *skim milk* foram removidos com alça e estriados em MSA. Após incubação (37°C;10%CO<sub>2</sub>;24 a 48h), colônias isoladas foram inoculadas em 25 ml de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) acrescido de 0,2% de extrato de levedura e 0,2% de extrato de carne (DB-Difco), incubadas sob as mesmas condições durante 18h. Os tubos foram centrifugados (4min, 2°C, ≈3000xg) e o meio de cultura descartado. Foi adicionado 1 ml de solução salina (NaCl 0.9%) gelada ao *pellet* e as células transferidas a microtubos de 2ml com tampa de rosca e *o-ring* (Axigen, EUA).

Os tubos foram centrifugados (2 min, 2°C, ≈9000xg), a solução salina descartada e o *pellet* celular congelado a -20°C até a extração do DNA.

O DNA genômico das diferentes espécies de estreptococos foi extraído utilizando-se o método de fenol-clorofórmio, que consiste ao *pellet* bacteriano previamente congelado a adição de solução TE e SDS 20% e incubação a 70 °C por 8 minutos. A parede celular é então rompida através do uso de *beads* de zircônia em aparato *mini bead beater* (1min, potência máxima). Posteriormente, o DNA foi purificado através de duas extrações com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e uma com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1).

O RNA foi eliminado pela adição de RNase (40min/40°C), e o DNA precipitado em presença de isopropanol, sais e baixa temperatura. O *pellet* de ácido nucléico foi re-suspendido em solução TE e as amostras foram estocadas a -20°C para posterior utilização. A qualidade do DNA extraído foi avaliada pela razão das absorbâncias ( $A_{260nm}/A_{260nm}$ ) e a integridade das amostras de DNA comprovada em gel de agarose a 1,2%, corado com 0,15 µg/ml de brometo de etídio, sob luz UV.

#### 3.3.2.2 Sistema de identificação por PCR com primers grupo-específicos e espécie-específicos.

A identificação genética dos isolados obtidos foi realizada através do sistema de classificação desenvolvido por Garnier et al. (9), o qual utiliza *primers* para o gene *ddl*, o qual é ubíquo entre procaríotos e codifica a enzima envolvida na

biossíntese de parede celular D-alanina:D-alanina ligase. Através deste sistema, duas etapas de PCR com *primers* grupo- e espécie-específicos foram aplicadas para identificar as duas principais espécies do grupo Sanguinis (*S. sanguinis*, *S. gordonii*) e duas espécies mais prevalentes do grupo Mitis (*S. mitis*, *S. oralis*), além da espécie *S. salivarius* e o grupo Anginosus. Os *primers* utilizados em cada etapa e o tamanho dos amplicons esperados estão descritos na Tabela 1. Como controles, foram utilizadas as cepas *S. mutans* UA159, *S. sanguinis* SK36, *S. gordonii* Challis substr CH1 *S. mitis* ATCC49456, *S. oralis* 00670, e *S. salivarius* 00457.

As reações de PCR foram realizadas conforme descrito anteriormente (9). Para as reações de PCR, foram utilizados: 37,25µl de H<sub>2</sub>O milli-Q, 5µl de Tampão PCR 10X, 1µl de dNTPs Mix 10mM, 2,5µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1,5µl de *Primer Forward* 10uM, 1,5µl de *Primer Reverse* 10uM, 0,25µl de Taq DNA Polimerase Recombinante Brasil 5U/µl (Invitrogen) e 50ng de DNA genômico. A princípio, as condições térmicas utilizadas consistiram de desnaturação inicial a 94 °C por 2 min., seguida de 20 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 54 °C por 1 min., extensão a 72 °C por 1 min., seguida de extensão final a 72 °C por 10 min.

Reações semelhantes foram realizadas numa segunda etapa com pares de *primers* espécie-específicos (F a I) para diferenciação dentro do grupo Mitis e Sanguinis.

Os produtos de PCR foram separados e analisados em géis de agarose a 1% e corados com brometo de etídio, sendo a identificação das espécies baseada no tamanho dos amplicons obtidos.

**Tabela 1** - Oligonucleotídeos utilizados para a identificação genética das espécies de *Streptococcus* não-hemolíticos.

Espécies de		Oligonucleotídeo	Tamanho esperado
<i>Streptococcus</i>	Par	Seqüência (5' – 3')	do Amplicon (bp)
<i>S. mitis</i>	GA	GTCGAAGGTGATGATATGAC	372
<i>S. oralis</i>		CTGCATTCTGACGCATGACAG	
<i>S. mutans</i>	GB	ATTGAAGGCGAGCCTTTAGAAAG CAACGATAACAGGATC	351
<i>S. salivarius</i>	GC	GCAGCAGTAGCAGAGACGCT GTCATGACTTCTGCAGGCAC	331
<i>S. gordonii</i>	GD	GTCGATGGCGAGGATCTAGAGC	208
<i>S. sanguinis</i>		ACCTCAATCTCGCGAGCCGT	
<i>Milleri group</i>	GE	TGCAGAAGTAGAGGCAAATC GCCAACTGCTTTTGGCTCCTT	217

Os primers grupo-específicos foram divididos em 5 grupos, sendo eles, GA ( *S. mitis* e *S. oralis*), GB ( *S. mutans*), GC (*S. salivarius*), GD (*S. gordonii* e *S. sanguinis*) e GE (*Milleri group*), com amplicons variando de 208 a 372 bp.

### 3.3.2 Análise dos resultados.

Os números de unidades formadoras de colônia (UFC) dos microrganismos cultiváveis e de *Streptococcus ssp.*, determinados respectivamente nas placas BHI e MSA, foram tabulados por criança e as proporções de *Streptococcus spp.* em relação ao total de microrganismos cultiváveis nas amostras bucais foram calculadas.

#### 4. RESULTADOS.

Para a realização do projeto foram coletadas amostras de saliva de 33 crianças obtendo-se um total de 396 cepas isoladas. Todas as cepas foram submetidas à análise por PCR. A distribuição dos isolados segundo a faixa etária é mostrada na Tabela 2. Em média, foram obtidos 12 isolados por indivíduo, sendo a maior quantidade de cepas isoladas no Grupo 4 (crianças de 11 a 13 meses).

**Tabela 2** - Distribuição dos isolados segundo a faixa etária das crianças e total de cepas isoladas.

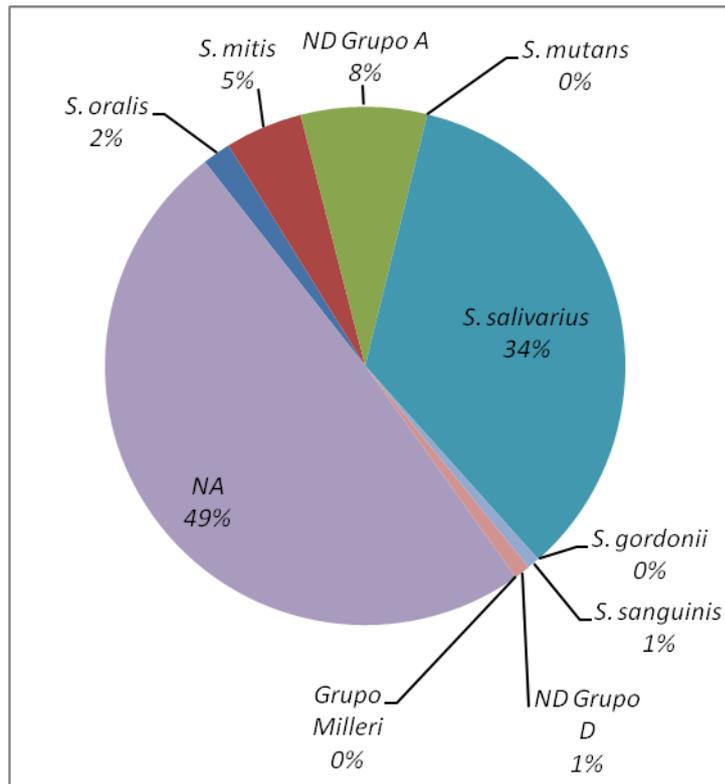
<b>Grupos de crianças</b>	<b>Nº de indivíduos analisados</b>	<b>Nº total de cepas isoladas</b>
G1 2-4 meses	6	55
G2 5-7 meses	6	69
G3 8-10 meses	8	93
G4 11-13 Meses	7	97
G5 14-16 meses	6	82
Total	33	396

Considerando todas as faixas etárias analisadas, a espécie mais prevalente nessa população foi *S. salivarius*, contabilizando 34,6% do total dos isolados testados (Tabela 3 e Figura 1). Cerca de metade dos isolados obtidos (n=195, 49,2%) não geraram amplicons (NA) com os *primers* utilizados para classificação em grupos e/ou espécies (Tabela 3).

**Tabela 3** - Espécies de *Streptococcus* spp. identificados em crianças de 2 a 16 meses, utilizando primers grupo/espécie específicos.

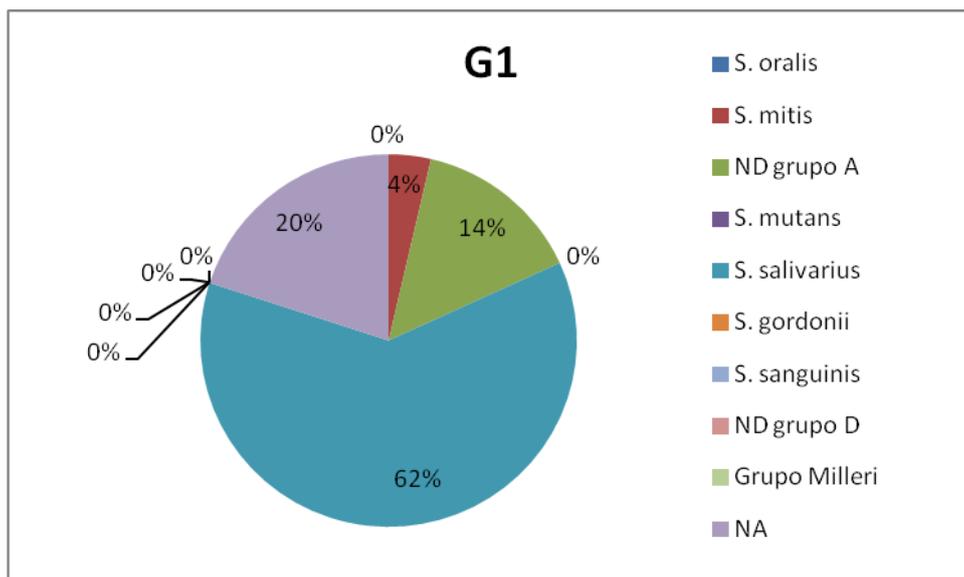
\*ND:sem determinação em espécie, NA: não gerou *amplicons*.

		Nº de cepas identificadas segundo número da criança de cada grupo etário																																
Primeira	Espécie de <i>Streptococcus</i>	G1 2 – 4 meses						G2 5-7 meses						G3 8-10 meses						G4 11-13 meses						G5 14 – 16 meses								
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6
A	<i>S. oralis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	3
	<i>S. mitis</i>	0	2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	2	0	6	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0
	ND	1	3	3	1	0	0	0	0	4	0	0	0	0	2	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	4	2	1	2	0	3	0	0
B	<i>S. mutans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	<i>S. salivarius</i>	8	10	5	5	0	6	1	2	3	1	4	0	1	3	3	1	3	6	2	0	15	7	3	8	2	2	3	3	11	11	0	2	6
	<i>S. gordonii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	<i>S. sanguinis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0
	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0
E	Grupo Milleri	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	NA	2	0	0	0	7	2	11	13	1	12	5	10	9	13	3	5	2	4	13	7	8	9	4	0	16	3	3	3	7	1	6	13	3
TOTAL		11	15	8	6	7	8	12	16	9	13	9	10	11	20	8	13	5	10	16	10	23	17	7	9	18	12	11	9	20	12	13	16	12



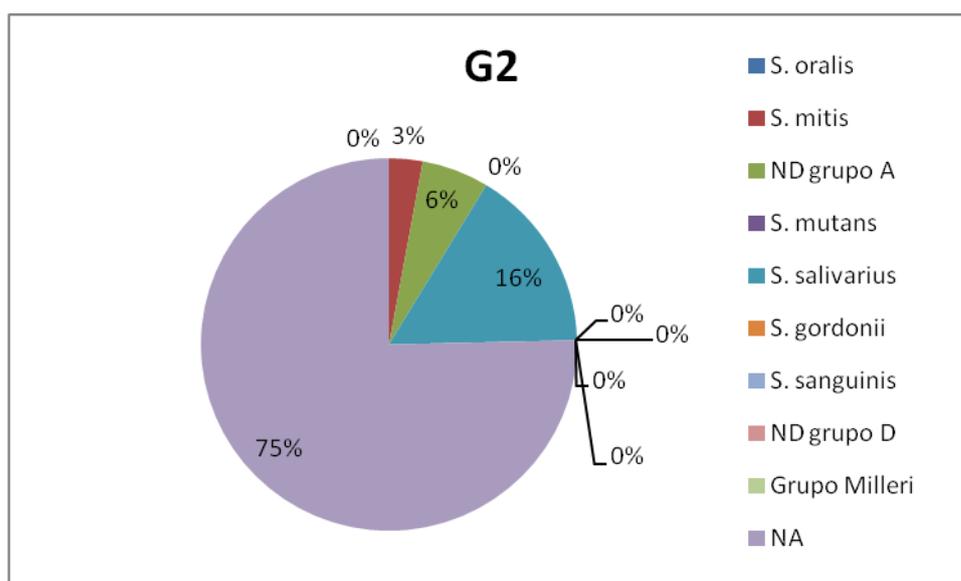
**Figura 1** - Cepas totais identificadas através de PCRs realizados para Grupo/específico (G/E) e Espécie – específico (E/E).

No Grupo 1 (figura 2), 18,18% (n=10) pertencem ao grupo A (*S. mitis* ou *S. oralis*). Destas, 2 cepas foram identificadas como *S. mitis* através de PCR específico enquanto que 8 cepas não tiveram sua espécie definida. A espécie mais prevalente neste grupo foi a *S. salivarius*, correspondendo por 61,81% do total de cepas isoladas. Cerca de 20% dos isolados não puderam ser identificados em grupos ou espécies, através do sistema de identificação por PCR proposto por Garnier et al. (1997).



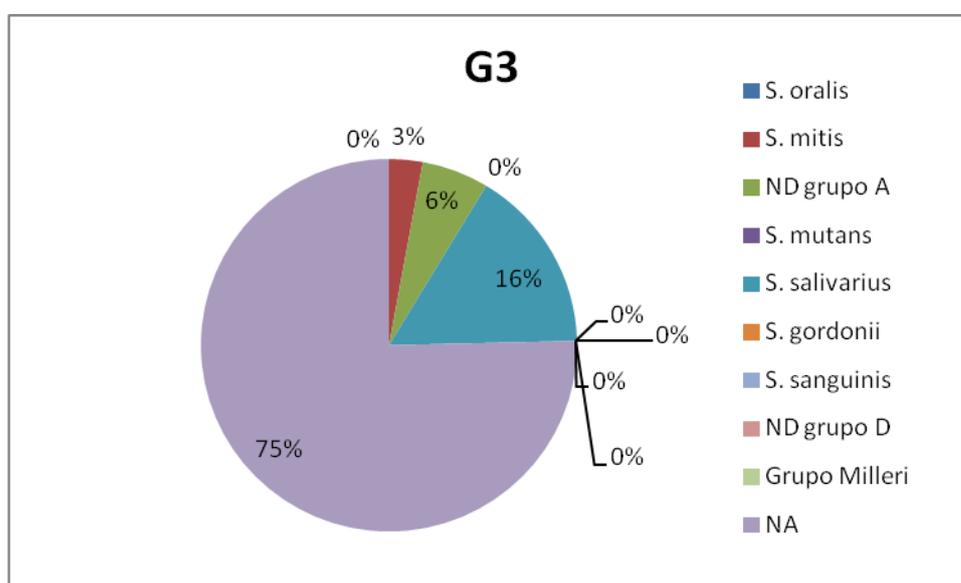
**Figura 2** - Cepas totais identificadas por PCRs G/E e E/E no Grupo 1.

Já no Grupo 2 (figura 3) 8,7% (n=6) das cepas isoladas pertencem ao grupo A (*S. mitis* ou *S. oralis*). Destas, 2 cepas foram identificadas como *S. mitis* através de PCR específico ou sequenciamento, enquanto que 4 cepas não tiveram sua espécie definida através de PCR específico. Dentre as espécies identificadas, a mais prevalente neste grupo foi a *S. salivarius*, correspondendo por 15,94%. Um grande número de isolados (N=52, 75,36% do total de cepas isoladas) não pôde ser identificado em grupos ou espécies, através do sistema de identificação por PCR proposto.



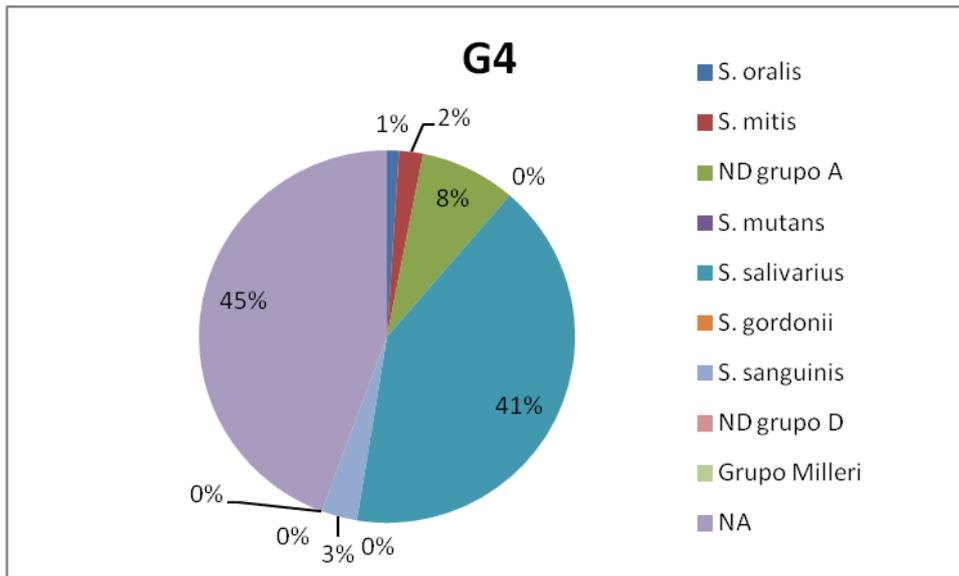
**Figura 3** - Cepas totais identificadas por PCRs G/E e E/E no Grupo 2.

No entanto no Grupo 3 (figura 4) , 19,35% (n=18) das cepas isoladas pertencem ao grupo A (*S. mitis* ou *S. oralis*). Destas, 11 cepas foram identificadas como *S. mitis*, 2 como *S. oralis*, enquanto que 5 cepas não tiveram sua espécie definida. Dentre as espécies identificadas, a mais prevalente neste grupo foi a *S. salivarius*, correspondendo por 20,43% (N=19). Em similar ao ocorrido no grupo 2, um grande número de isolados (N=56, 60,21% do total de cepas isoladas neste grupo) não pôde ser identificado em grupos ou espécies, através do sistema de identificação por PCR proposto.



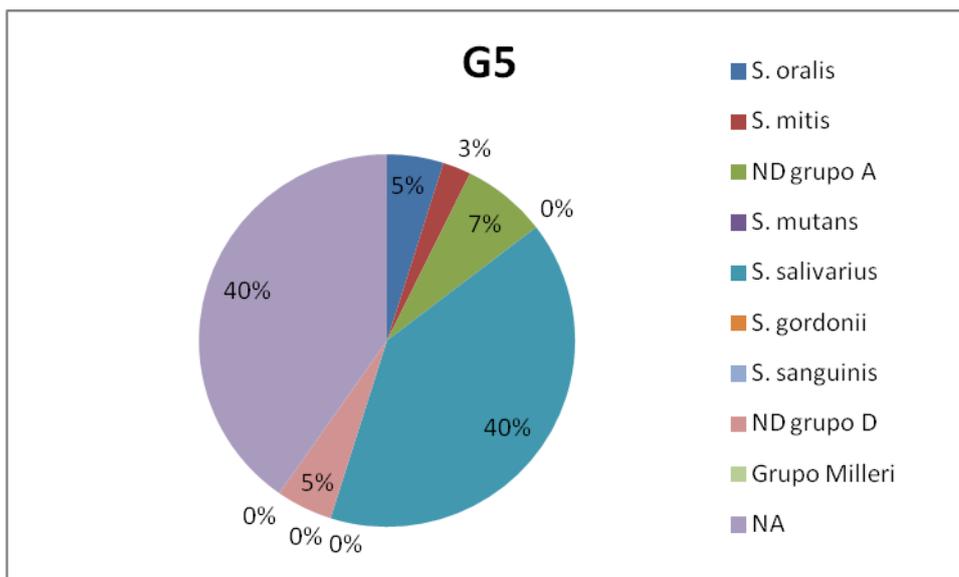
**Figura 4** - Cepas totais identificadas por PCRs G/E e E/E no Grupo 3.

No Grupo 4 (figura 5) , uma maior diversidade de estreptococos foi encontrada, comparando-se aos grupos anteriores. Um total de 11,34% (n=11) das cepas isoladas pertence ao grupo A (*S. mitis* ou *S. oralis*). Destas, 2 cepas foram identificadas como *S. mitis*, 1 como *S. oralis*, enquanto que 8 cepas não tiveram sua espécie definida através de PCR específico. Neste grupo identificamos 3 cepas (3,09% do total) como pertencentes à espécie *S. sanguinis*. Dentre as espécies identificadas, a mais prevalente neste grupo foi a *S. salivarius*, correspondendo por 41,23% (N=40). Um grande número de isolados (N=43, 44,33% do total de cepas isoladas) não pôde ser identificado em grupos ou espécies, através do sistema de identificação por PCR proposto.



**Figura 5** - Cepas totais identificadas por PCRs G/E e E/E no Grupo 4.

E por fim, no Grupo 5 (figura 6), grande diversidade de estreptococos foi encontrada, assim como no G4. Um total de 14,63% (n=12) das cepas isoladas pertence ao grupo A (*S. mitis* ou *S. oralis*). Destas, 2 cepas foram identificadas como *S. mitis*, 4 como *S. oralis*, enquanto que 6 cepas não tiveram sua espécie definida. Dentre as espécies identificadas, a mais prevalente neste grupo foi a *S. salivarius*, correspondendo por 40,24% (N=33). Neste grupo identificamos cepas (n=4) possivelmente relacionadas ou pertencentes à espécie *S. gordonii* ou *S. sanguinis*, embora a identificação em nível de espécie não tenha sido possível. Em similar ao ocorrido em grupos anteriores, um grande número de isolados (N=33, 40,24% do total de cepas isoladas neste grupo) não pôde ser identificado em grupos ou espécies, através do sistema de identificação por PCR proposto.



**Figura 6** - Cepas totais identificadas por PCRs G/E e E/E no Grupo 5.

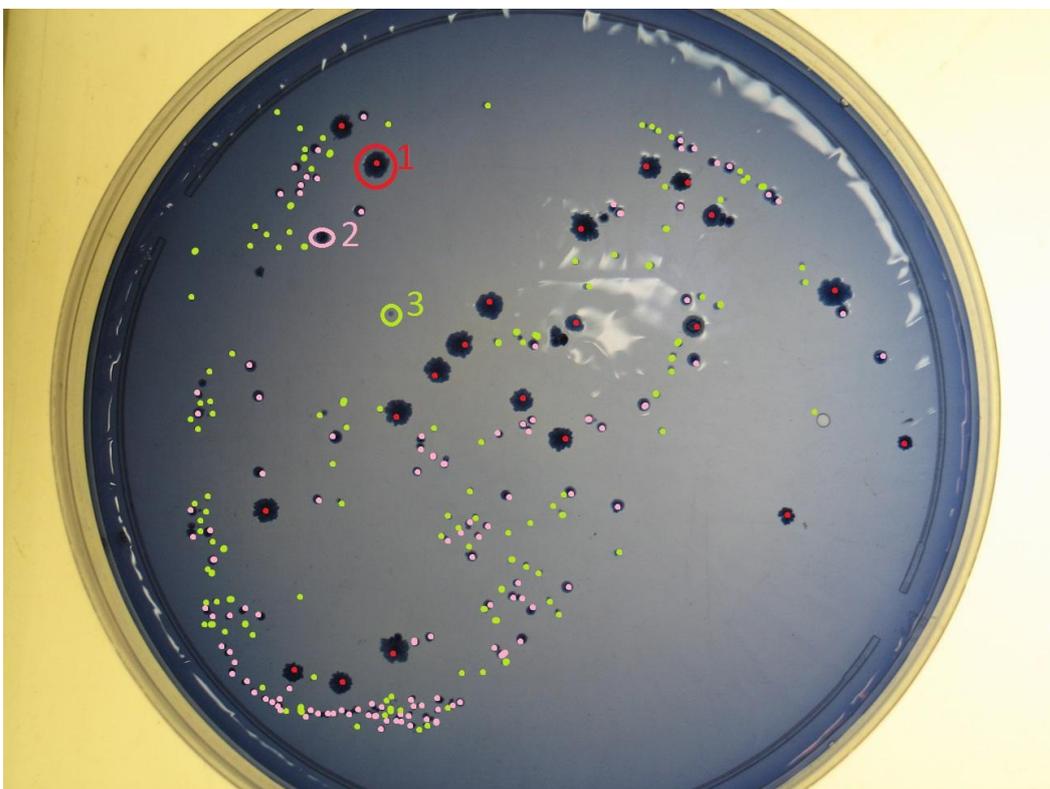
Na tabela 4 é possível visualizar a prevalência dos principais grupos de *Streptococcus* entre crianças edêntulas ou com um ou mais dentes irrompidos. Observamos que entre a faixa etária do G1 e G2, onde a totalidade das crianças analisadas eram edêntulas, encontramos apenas espécies dos Grupos A e C, sendo a maioria *S. salivarius* (Grupo C). Enquanto que nas faixas etárias do G3 ao G5, em que 100% das crianças já apresentavam um ou mais dentes irrompidos, o *S. salivarius* (Grupo C) também foi maioria, seguidos pelo Grupo A e Grupo D.

**Tabela 4** - Prevalências dos principais grupos de *Streptococcus* entre crianças edêntulas e crianças com um ou mais dentes irrompidos.

Faixa etária	Crianças edêntulas (n=12)			Cçs com 1 ou mais dentes irrompidos (n= 21)		
	Grupo A	Grupo C	Grupo D	Grupo A	Grupo C	Grupo D
G1	10	34	0	0	0	0
G2	6	11	0	0	0	0
G3	0	0	0	18	19	0
G4	0	0	0	11	40	3
G5	0	0	0	12	33	4

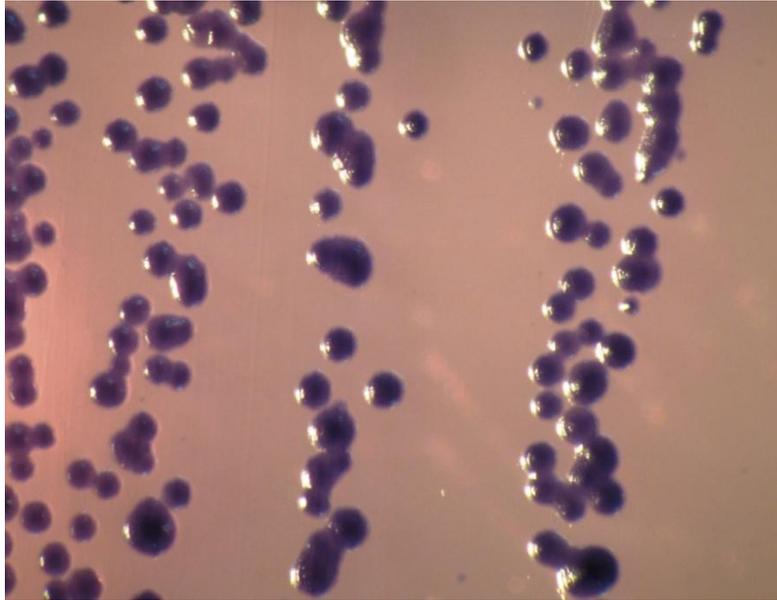
A cultura inicial das amostras coletadas de saliva foram plaqueadas e incubadas como descrito anteriormente. Como exemplificado na figura 7, tipos

morfológicos distintos foram identificados (n=3), isolados em cultura pura e tiveram fotografias digitais em aumento de 32x com auxílio de lupa estereoscópica (Figuras 8, 9, 10, 11 e 12). As imagens serviram como base para possível identificação presuntiva das espécies e/ou grupos de espécies.



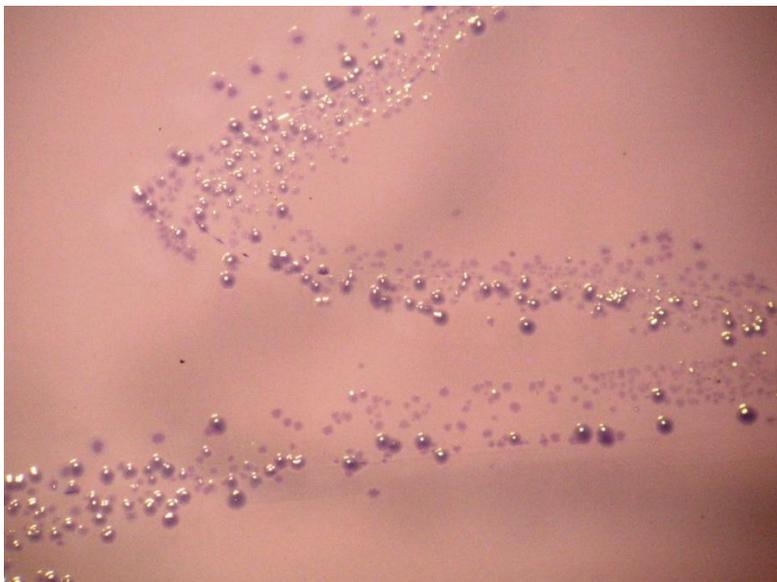
**Figura 7** - Foto ilustrativa de diferentes tipos morfológicos dos isolados encontrados em cultura primária de amostra bucal, crescidos em meio MSA a 37°C em estufa a 10% CO<sub>2</sub> durante 48h.

Na figura 8, tipo morfológico compatível com culturas puras de *S. salivarius*, confirmados posteriormente por PCR. Observam-se colônias com borda contínua, baixa a média altura, de coloração azul marinho, brilhantes e de aspecto liso.



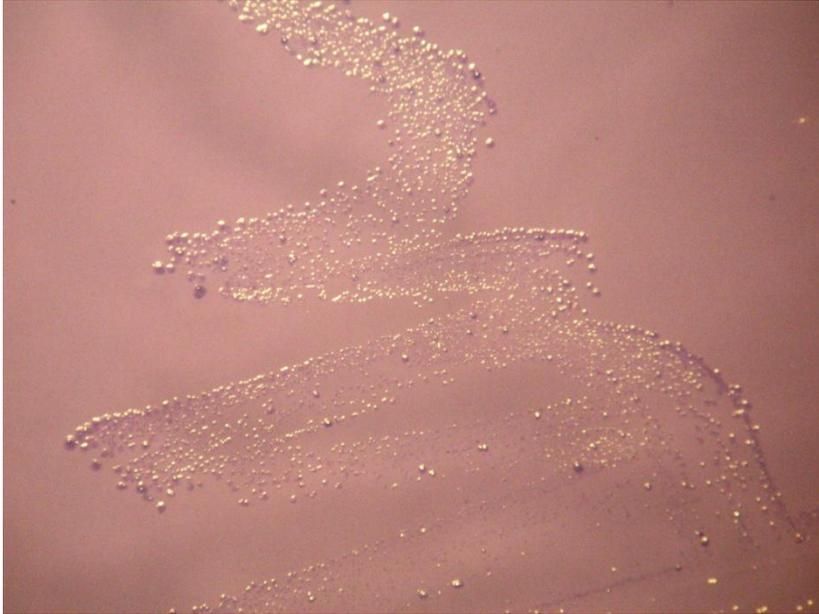
**Figura 8** - Cultura pura de *S. salivarius*.

Na figura 9, tipo morfológico compatível com culturas puras de *S. mitis*, confirmados posteriormente por PCR. Observam-se colônias pequenas, baixa altura, de coloração azul claro a cinza, brilhantes, com eventual intensificação da coloração na região central.



**Figura 9** - Cultura pura de *S. mitis*.

Na figura 10, tipo morfológico compatível com culturas puras de *S. oralis*, confirmados posteriormente por PCR. Observam-se colônias pequenas, baixa altura, com pouca coloração, brilhantes e de aspecto liso.



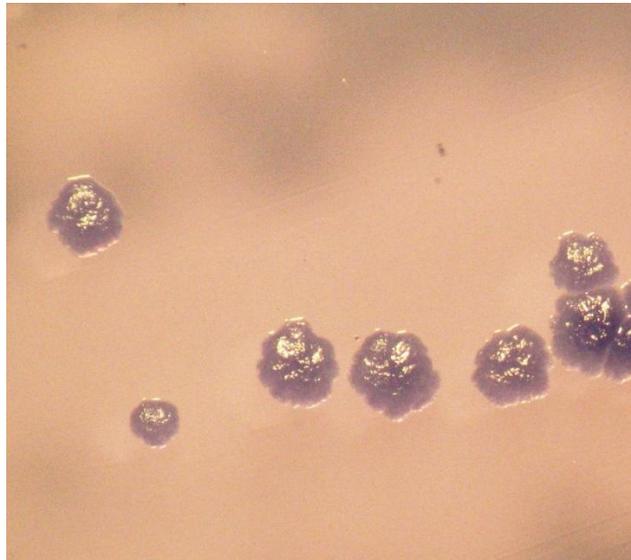
**Figura 10** - Cultura pura de *S. oralis*.

Na figura 11, tipo morfológico compatível com culturas puras de *S. sanguinis*, confirmados posteriormente por PCR. Observam-se colônias com média altura, de coloração azul claro a cinza, brilhantes e lisas.



**Figura 11** - Cultura pura de *S. sanguinis*.

Na figura 12, tipo morfológico de culturas puras de espécie não identificada. Neste caso, observam-se colônias com média altura, com bordas irregulares, de coloração azul claro a cinza, com aspecto rugoso.



**Figura 12** - Exemplo de cultura não determinada (ND).

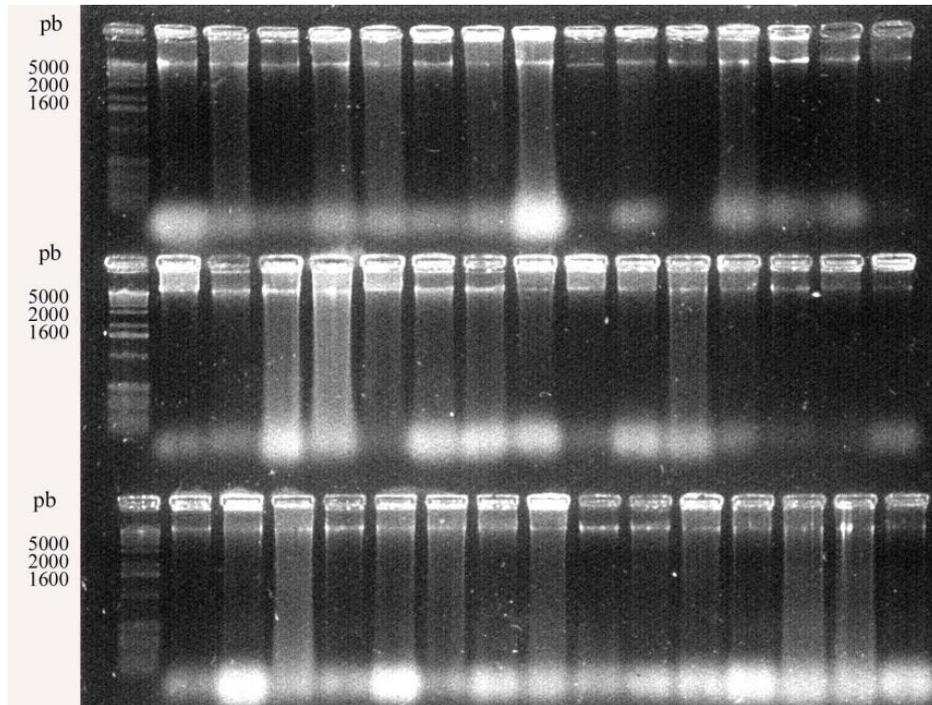
Já na tabela 5, está quantificado os níveis de bactérias no gênero *Streptococcus* em relação ao número de microrganismos totais cultiváveis. A percentagem de *Streptococcus* variou de 83 a 100% em relação ao de microrganismos totais. A menor percentagem obtida em G1 foi de 83%, em G2 de 83,6%, no grupo 3 encontramos 90,5%, já em G4 87,5% e finalmente 95,8% em G5. Dos 33 indivíduos analisados, cerca de 40% (n=13) apresentaram níveis de *Streptococcus* em relação ao total de microrganismos cultiváveis igual a 100%.

**Tabela 5** - Níveis de bactérias no gênero *Streptococcus* em relação ao número de microrganismos totais cultiváveis obtidos de amostras de saliva de crianças de 2 e 16 meses de idade.

Níveis salivares de microrganismos (log<sub>10</sub> UFC/mL) segundo número da criança de cada grupo etário.

	G1 2-4 meses						G2 5-7 meses						G3 8-10 meses								G4 11-13 meses							G5 14-16 meses					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6
Estreptococos totais	7,1	5,7	5,3	6,2	6,4	6,8	7,0	7,2	6,3	6,4	5,1	6,2	5,6	6,8	6,4	6,7	6,5	6,6	6,4	7,1	6,6	6,5	6,8	6,8	5,7	6,2	6,4	5,9	7,1	7,2	6,1	5,4	7,2
Microrganismos totais	7,1	6,1	7,1	6,3	6,4	6,8	7,1	7,2	6,3	6,4	6,1	7,2	6,2	6,8	6,6	6,8	6,7	6,9	6,4	7,2	6,8	6,5	6,8	6,9	5,9	6,2	7,3	6,2	7,1	7,4	6,1	5,4	7,3
% Estreptococos	100	94,4	83	98,4	100	100	99,1	100	100	100	83,6	86,1	90,5	100	97,6	97,8	96,8	95,4	100	99	98,2	100	100	98,5	95,8	99,8	87,5	95,8	100	97,3	100	100	98,6

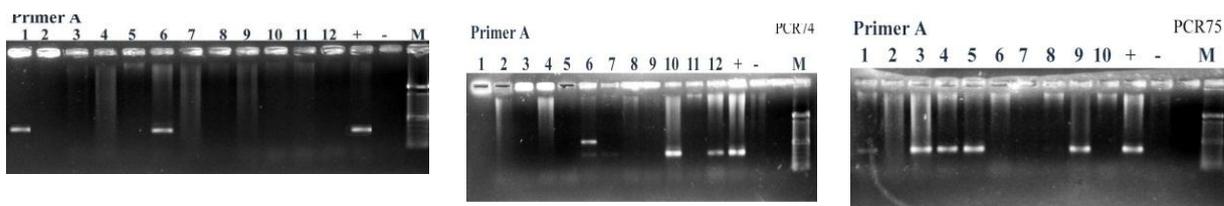
A integridade do DNA genômico de todas as amostras foram analisadas em géis de agarose como o observado na figura 13. Podemos ver que no primeiro espaço está o peso molecular e no restante está nítido as amostras acesas.



**Figura 13** - Gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio para verificar a qualidade das amostras de DNA extraído pelo método fenol-clorofórmio. Um total de 4uL de cada amostra foram aplicados por canaleta.

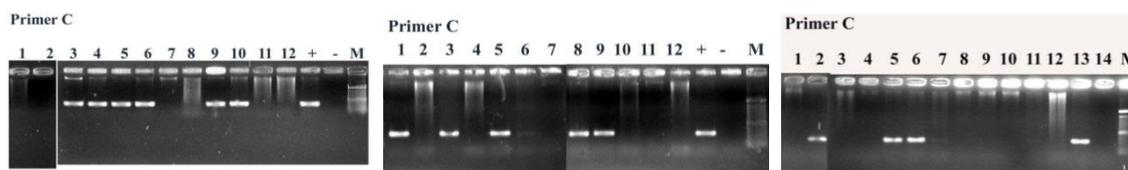
As reações de PCR geraram *amplicons* de tamanho esperado, quando os *primers* para os grupos *S. mitis* (Figura 14), *S. salivarius* (Figura 15), e o grupo *S. sanguinis* e *S. gordonii* foram utilizados (Figura 16).

Para o *S. mitis*, na figura 14, podemos observar que acenderam 3, 4 e 6 amostras respectivamente em cada gel.



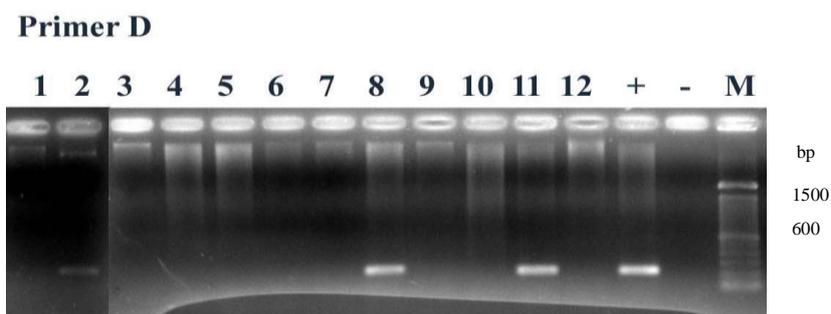
**Figura 14** - Produtos de PCR em gel de agarose 1% obtidos em reações com isolados de três crianças e par de primers específico para o gupo Mitis (*S. mitis* e *S. oralis* (Primer A). Produtos específicos de 372pb foram observados para diversas amostras. +: controle positivo (*S. mitis* 49456). -: controle negativo (água).

O *S. salivarius* foi a espécie mais encontrada, por isso essa extensa quantidade de amostras acesas na figura 15.



**Figura 15** - Produtos de PCR em gel de agarose 1%, obtidos em reações com isolados de três crianças e par de *primers* específico para *S. salivarius* (Primer C). Amplicons de tamanho esperado (331 pb) foram obtidos para diversos isolados. +: controle positivo (*S. salivarius* 0457). -: controle negativo (água).

Na figura 16, podemos observar as únicas 3 amostras que acenderam para os *primers* do grupo D (*S. gordonii* e *S. sanguinis*).



**Figura 16** - Produtos de PCR em gel de agarose 1% obtidos em reações com 12 isolados de uma criança com par de *primers* específicos para *S. sanguinis* e *S. gordonii* (Primers D). Amplicons de tamanho esperado (208 pb) foram obtidos para 3 isolados (canaletas 2, 8 e 11). +: controle positivo (*S. sanguinis* SK36). -: controle negativo (água).

## 5. DISCUSSÃO.

Cerca de metade dos isolados obtidos (n=195, 49,2%) não geraram amplicons (NA) com os *primers* utilizados para classificação em grupos e/ou espécies (Tabela 3), o que indica que o sistema de identificação por PCR aplicado não foi capaz de identificar um grande número de isolados de estreptococos da cavidade bucal. Como controle, selecionamos um sub-grupo (N=15) de cepas (NA) nas quais realizamos o sequenciamento do *16SrRNA* para fins de identificação destas amostras. Os resultados foram confrontados com as seqüências do banco de dados *Ribosome Database Project* (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu/>), para identificação taxonômica em nível de espécie. Os resultados indicaram que a maioria 53,3%, (n=8) dos isolados correspondeu à espécie *S. salivarius* e 26,6% (n=4) à espécie *S. mitis*. Entretanto, 2 cepas (13,3%) corresponderam à espécie *Lactococcus lactis* e 1 cepa (6,7 %) à espécie *Rothia mucilaginosa*.

O gênero *Lactococcus* foi criado para acomodar *Streptococcus* não hemolíticos do grupo N de Lancefield e fazem parte da microbiota normal (30). Da mesma forma, *Rothia mucilaginosa*, previamente denominada *Stomatococcus mucilaginosus*, consiste em espécie Gram-positiva catalase-negativa ou positiva que também faz parte da microbiota humana normal (30). As características fenotípicas destas duas espécies são comumente confundidas com a de espécies não-hemolíticas do gênero *Streptococcus* (30). Um aprimoramento da técnica de identificação das espécies de estreptococos é requerido para abranger um maior número de isolados cultiváveis em *Mitis Salivarius Agar*. O sequenciamento *16SrRNA* apresenta-se como opção de escolha que apresenta grande sensibilidade na identificação de espécies bacterianas (31). Entretanto demanda um maior tempo de processamento das amostras e apresenta ainda custo relativamente alto.

No estudo realizado por Garnier *et. al*, 1997 (9), o qual envolveu 91 cepas clínicas, 100% delas tiveram o DNA amplificado e através de reações de PCR utilizando *primers* espécie-específicos, sendo todas identificadas em espécie. Entretanto, os autores, mencionaram a necessidade de alterações das condições térmicas para identificação de alguns isolados (9). Kononen *et al.*, 2002 (16), coletaram amostras de 50 bebês recém nascidos, saudáveis, nas idades de 2, 6, 12, 18 e 24 meses de idade. O estudo indicou que *Streptococcus* são encontrados em todos os pacientes em todos os períodos analisados. *S. mitis* foi o mais prevalente

em todos os grupos etários, atingindo sua maior prevalência juntamente com *S. salivarius* durante o primeiro ano de vida. Estes dados são corroborados em crianças da Malásia, onde Arief *et al.*, 2005 (30) comumente encontrou *S. mitis*, *S. salivarius* e *S. oralis* independente da criança possuir fissura palatina ou não, nas idades de 3 a 39 meses de idade.

Analisando os resultados das contagens de estreptococos totais e sua proporção em relação ao total de microrganismos cultiváveis, verificamos que os estreptococos consistiram na grande maioria da microbiota cultivável nas faixas etárias estudadas (Tabela 5). Zou *et al.* (2004) (32), analisaram 12 crianças Chinesas sadias com idades de 1, 3, 6, 9 e 12 meses. Os achados indicaram a espécie *S. salivarius* como a mais frequentemente isolada, seguida pelas espécies *S. mitis*, *S. sanguinis* e *S. gordonii*. Resultados semelhantes foram obtidos em nossa população. Estudos longitudinais que visam caracterizar o desenvolvimento da microbiota do trato respiratório superior em crianças caucasianas entre as idades de 2, 6, 12, 18 e 24 meses indicam que, entre 50 crianças, as espécies mais prevalentes no primeiro ano de vida são *S. mitis* e *S. salivarius* (34). As espécies *S. oralis* and *S. sanguinis* parecem não aumentar significativamente antes dos 12 meses de vida (34). Em nossas análises, observamos o isolamento destas espécies apenas em crianças com maior idade (Grupo 4 e Grupo 5). Em indivíduos com maior idade (3 a 12 anos) a prevalência de *S. salivarius* pode chegar a 50% dos indivíduos, enquanto a espécie *S. mitis* pode ser recuperada de até 60% dos pacientes (33). Estudos com crianças entre as idades de 2 e 24 meses indicam que a presença de estreptococos é constante em todas as faixas etárias do intervalo (34). Analisando os resultados das contagens de estreptococos totais e sua proporção em relação ao total de microrganismos cultiváveis, verificamos que os estreptococos consistiram na grande maioria da microbiota cultivável em todas as faixas etárias (Tabela 5).

## 6. CONCLUSÃO

- 1) *Streptococcus* compreendem a maior parte dos microrganismos bucais cultiváveis na amostra estudada.
- 2) As espécies predominantes de *Streptococcus* incluem as do Grupo Salivarius, seguida do Grupo Mitis (*S. mitis* e *S. oralis*).
- 3) Um grande número de isolados não puderam ser identificados (N=195 - 49%), com o sistema de PCR utilizado, possivelmente pela grande diversidade nos *loci* genômicos alvo do sistema empregado.
- 4) As espécies colonizadoras dos dentes, *S. sanguinis* e *S. gordonii* foram identificadas apenas a partir da idade de 11 meses, época em que as crianças apresentam dentes irrompidos na cavidade oral.
- 5) Entre os isolados não identificados pelo sistema de PCR, as análises de sequenciamento do gene 16SRNA indicam que predominam isolados do gênero *Streptococcus* seguidos de outros gêneros relacionados, como *Lactococcus spp.* e *Rothia spp.*

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.**

1. **Aas, J. A., A. L. Griffen, S. R. Dardis, A. M. Lee, I. Olsen, F. E. Dewhirst, E. J. Leys, and B. J. Paster.** 2008. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J.Clin.Microbiol.* **46**:1407-1417.
2. **Alves, A. C., R. D. Nogueira, R. N. Stipp, F. Pampolini, A. B. Moraes, R. B. Goncalves, J. F. Hofling, Y. Li, and R. O. Mattos-Graner.** 2009. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. *J.Med.Microbiol.* **58**:476-481.
3. **Banas, J. A. and M. M. Vickerman.** 2003. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev.Oral Biol.Med.* **14**:89-99.
4. **Bek-Thomsen, M., H. Tettelin, I. Hance, K. E. Nelson, and M. Kilian.** 2008. Population diversity and dynamics of *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus infantis* in the upper respiratory tracts of adults, determined by a nonculture strategy. *Infect.Immun.* **76**:1889-1896.
5. **Caufield, P. W., G. R. Cutter, and A. P. Dasanayake.** 1993. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J.Dent.Res.* **72**:37-45.
6. **Caufield, P. W., A. P. Dasanayake, Y. Li, Y. Pan, J. Hsu, and J. M. Hardin.** 2000. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect.Immun.* **68**:4018-4023.
7. **Diaz, P. I., N. I. Chalmers, A. H. Rickard, C. Kong, C. L. Milburn, R. J. Palmer, Jr., and P. E. Kolenbrander.** 2006. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl.Environ.Microbiol.* **72**:2837-2848.
8. **Facklam, R.** 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin.Microbiol.Rev.* **15**:613-630.

9. **Garnier, F., G. Gerbaud, P. Courvalin, and M. Galimand.** 1997. Identification of clinically relevant viridans group streptococci to the species level by PCR. *J.Clin.Microbiol.* **35**:2337-2341.
10. **Ge, Y., P. W. Caufield, G. S. Fisch, and Y. Li.** 2008. Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis colonization correlated with caries experience in children. *Caries Res.* **42**:444-448.
11. **Hohwy, J. and M. Kilian.** 1995. Clonal diversity of the Streptococcus mitis biovar 1 population in the human oral cavity and pharynx. *Oral Microbiol.Immunol.* **10**:19-25.
12. **Holmstrup, P., A. H. Poulsen, L. Andersen, T. Skuldbol, and N. E. Fiehn.** 2003. Oral infections and systemic diseases. *Dent.Clin.North Am.* **47**:575-598.
13. **Kawamura, Y., X. G. Hou, F. Sultana, H. Miura, and T. Ezaki.** 1995. Determination of 16S rRNA sequences of Streptococcus mitis and Streptococcus gordonii and phylogenetic relationships among members of the genus Streptococcus. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **45**:406-408.
14. **Kilian, M., K. Poulsen, T. Blomqvist, L. S. Havarstein, M. Bek-Thomsen, H. Tettelin, and U. B. Sorensen.** 2008. Evolution of Streptococcus pneumoniae and its close commensal relatives. *PLoS.One.* **3**:e2683.
15. **Kononen, E.** 1999. Oral colonization by anaerobic bacteria during childhood: role in health and disease. *Oral Dis.* **5**:278-285.
16. **Kononen, E., H. Jousimies-Somer, A. Bryk, T. Kilp, and M. Kilian.** 2002. Establishment of streptococci in the upper respiratory tract: longitudinal changes in the mouth and nasopharynx up to 2 years of age. *J.Med.Microbiol.* **51**:723-730.
17. **Kuramitsu, H. K., X. He, R. Lux, M. H. Anderson, and W. Shi.** 2007. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **71**:653-670.

18. **Marsh, P. D.** 2003. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* **149**:279-294.
19. **Nogueira, R. D., A. C. Alves, W. F. King, R. B. Goncalves, J. F. Hofling, D. J. Smith, and R. O. Mattos-Graner.** 2007. Age-specific salivary immunoglobulin A response to *Streptococcus mutans* GbpB. *Clin.Vaccine Immunol.* **14**:804-807.
20. **Nogueira, R. D., A. C. Alves, M. H. Napimoga, D. J. Smith, and R. O. Mattos-Graner.** 2005. Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. *Infect.Immun.* **73**:5675-5684.
21. **Nogueira, R. D., W. F. King, G. Gunda, S. Culshaw, M. A. Taubman, R. O. Mattos-Graner, and D. J. Smith.** 2008. Mutans streptococcal infection induces salivary antibody to virulence proteins and associated functional domains. *Infect.Immun.* **76**:3606-3613.
22. **Park, H. K., S. S. Shim, S. Y. Kim, J. H. Park, S. E. Park, H. J. Kim, B. C. Kang, and C. M. Kim.** 2005. Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut. *J.Microbiol.* **43**:345-353.
23. **Paster, B. J., S. K. Boches, J. L. Galvin, R. E. Ericson, C. N. Lau, V. A. Levanos, A. Sahasrabudhe, and F. E. Dewhirst.** 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J.Bacteriol.* **183**:3770-3783.
24. **Smith, D. J., W. F. King, H. Akita, and M. A. Taubman.** 1998. Association of salivary immunoglobulin A antibody and initial mutans streptococcal infection. *Oral Microbiol.Immunol.* **13**:278-285.
25. **Smith, D. J., W. F. King, and M. A. Taubman.** 1990. Salivary IgA antibody to oral streptococcal antigens in predecidate infants. *Oral Microbiol.Immunol.* **5**:57-62.
26. **Smith, D. J. and R. O. Mattos-Graner.** 2008. Secretory immunity following mutans streptococcal infection or immunization. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **319**:131-156.

27. **Smith, D. J. and M. A. Taubman.** 1993. Emergence of immune competence in saliva. *Crit Rev.Oral Biol.Med.* **4**:335-341.
28. **Smith, D. J. and M. A. Taubman.** 1995. Development of salivary IgA antibody to oral streptococcal antigens associated with virulence. *Adv.Exp.Med.Biol.* **371B**:1141-1143.
29. **Westergren G, Krasse B.** 1978. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and Lactobacillus infection. *Journal Clinical Microbiology* **7**:82-83.
30. **Arief, E. M., Mohamed, Z., Idris, F.M.** 2005. Study of viridans streptococci and Staphylococcus species in cleft lip and palate patients before and after surgery. *Cleft Palate Craniofac J.* **42**(3): 277-9.
31. **Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM.** 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;**37**(Database issue):D141-5
32. **Zou J, Zhou XD, Li SM.** 2004. Analysis of oral microflora early colonized in infants. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2004 Apr;**22**(2):126-8. [Article in Chinese]
33. **Salako NO, Rotimi VO, Preeta R, Khodakhast F.** 2004. The bacteriology of the supragingival plaque of child dental patients in Kuwait. *Med Princ Pract.* 2004 Jul-Aug;**13** (4):191-5.
34. **Könönen E, Jousimies-Somer H, Bryk A, Kilp T, Kilian M.** 2002. Establishment of streptococci in the upper respiratory tract: longitudinal changes in the mouth and nasopharynx up to 2 years of age. *J Med Microbiol.* 2002 Sep;**51** (9):723-30.

## CÓPIA DO CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



### CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Análise da colonização bucal de crianças com 2 a 16 meses de idade por espécies não-hemolíticas do gênero Streptococcus**", protocolo nº 055/2010, dos pesquisadores Renata de Oliveira Mattos Graner e Mariana da Fonseca, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 02/07/2010.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Analysis of the oral colonization by non-hemolytic Streptococci in young infants**", register number 055/2010, of Renata de Oliveira Mattos Graner and Mariana da Fonseca, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 07/02/2010.

**Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas**  
Secretário  
CEP/FOP/UNICAMP

**Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**  
Coordenador  
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.  
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

**CÓPIA DO PARECER DE APROVAÇÃO DO RELATÓRIO FINAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PELOS ACESSORES *ad hoc* DA FAPESP OU CNPQ.**

**VISUALIZAÇÃO DE DESPACHO**

<b>Processo</b>	2010/06786-8
<b>Linha de Fomento</b>	Programas Regulares / Bolsas / No País / Iniciação Científica - Fluxo Contínuo
<b>Situação</b>	Em Execução
<b>Vigência</b>	01/07/2010 a 30/06/2012
<b>Beneficiário</b>	Mariana da Fonseca
<b>Responsável</b>	Renata de Oliveira Mattos Graner
<b>Vínculo Institucional do Processo</b>	Faculdade de Odontologia de Piracicaba/FOP/UNICAMP

**Folha de Despacho**

**Datas do Despacho**

**Emitido em / por:** 03/10/2012 andrea faria saraiva

**Objetos de análise**

<b>Objeto de análise</b>	<b>Data de Submissão</b>	<b>Resultado</b>
Relatório Científico 4	16/07/2012	Aprovado

**Observações / Transcrições / Frases**

**Observações ao Responsável**

Comunicamos que seu Relatório Científico foi analisado pela assessoria científica da FAPESP.

Para visualizar o parecer, V.Sa. deve acessar o Sistema SAGe ([www.fapesp.br/sage](http://www.fapesp.br/sage)), clicar item do menu Processos/Meus Processos, clicando em Mais Informações "Consultar Despachos".

Atenciosamente,

Carlos Henrique de Brito Cruz  
Diretor Científico da FAPESP

**OBSERVAÇÕES:**

Obs.1: "A transcrição do parecer está sendo enviada exclusivamente ao orientador(a), sendo de sua responsabilidade compartilhar as partes que considerar relevantes com o estudante candidato, o qual receberá uma cópia desta mensagem(sem transcrição do parecer)."

**Frases para o Responsável**

*Não há frases associadas.*

**Transcrição de Parecer para o Responsável**

**Parecer do Relatório Científico**

-----

Trata-se de relatório final de iniciação científica. O relatório foi muito bem elaborado e com resultados interessantes e inéditos. Considero o relatório aprovado.

-----

**Frases para Termo de Outorga**

*Não há frases associadas.*

**Relatório Científico 4 (Aprovado)**

<b>Compromisso</b>	10/07/2012
<b>Período relacionado</b>	10/12/2011 a 30/06/2012
<b>Situação</b>	Atendido