



ANEXO 2

CONCORDÂNCIA DO ORIENTADOR

Declaro que o (a) aluno (a) Lisnira Dias Shebalde RA 091640
esteve sob minha orientação para a realização do Trabalho de Conclusão de Curso
intitulado Análise filogenética de cepas de Streptococcus no ano de 2012

dos grupos mitis e sanguinis isolados da cavidade bucal de crianças durante
as fases iniciais de colonização

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, 8 de outubro de 2012

(nome e assinatura do orientador)



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



**Análise filogenética de cepas de *Streptococcus*
dos grupos Mitis e Sanguinis isolados da cavidade bucal de
crianças durante as fases iniciais de colonização.**

8 DE OUTUBRO DE 2012

PIRACICABA –SP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Autor (a): Jéssica Dias Theobaldo

**Análise filogenética de cepas de *Streptococcus*
dos grupos Mitis e Sanguinis isolados da cavidade bucal de
crianças durante as fases iniciais de colonização.**

Orientador (a): Renata de Oliveira Mattos Granner

Co – Orientador (a): Erika Harth Chu

8 DE OUTUBRO DE 2012

PIRACICABA -SP

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

T342a	Theobaldo, Jessica Dias, 1989- Análise filogenética de cepas de Streptococcus dos grupos Mitis e Sanguinis isolados da cavidade bucal de crianças durante as fases iniciais de colonização / Jessica Dias Theobaldo. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2012. Orientador: Renata de Oliveira Mattos Granner. Coorientador: Erika Harth Chu. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Diversidade genética. 2. Streptococci viridans. I. Mattos-Graner, Renata de Oliveira, 1971- II. Chu, Erika Harth. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.
-------	---

Dedicatória

Dedico este trabalho a toda minha família e especialmente ao meu pai Luis, à minha mãe Tânia e ao meu irmão Guilherme.

Também dedico a todos meus amigos e amigas em especial, Clízia e Mariana, pela oportunidade de passar com vocês 4 anos inesquecíveis.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por todas as oportunidades que surgiram em minha vida, e por ter colocado em meu caminho pessoas especiais que contribuíram muito para minha formação não só profissional, mas também como pessoa.

Agradeço a meus pais, por toda educação que tive, pelas oportunidades e pelo apoio. Pois muitas vezes, abriram mão de seus sonhos para que os meus fossem realizados.

Agradeço a todos os meus amigos de faculdade, pelos 4 anos muito bem vividos nesta faculdade. Com vocês ao meu lado os obstáculos e dificuldades se tornaram mais fáceis.

Agradeço a Faculdade de Odontologia de Piracicaba por toda estrutura oferecida para meu aprendizado.

Agradeço a todos os funcionários que me ajudaram, me apoiaram tanto de forma direta quanto indireta.

Agradeço a todos os meus professores que tiveram a humildade, a paciência e o prazer de transmitir todo seu conhecimento para que eu me tornasse uma profissional excelente. Sem vocês nada disso seria possível. Em especial a Prof^a Renata de Oliveira Mattos Graner, que me deu a oportunidade de conhecer o mundo científico, através da Iniciação Científica.

Agradeço aos pesquisadores da Área de Microbiologia e Imunologia do Depto. de Diagnóstico Oral, Rafael Nóbrega Stipp e Erika Harth Chu por toda a paciência e por todo apoio que me deram para a realização deste trabalho.

Resumo

A cavidade bucal consiste em uma das regiões com maior diversidade e quantidade de microrganismos que colonizam o corpo humano. Apesar das variações individuais, bactérias do gênero *Streptococcus* estão entre os microrganismos predominantes na microbiota bucal desde a infância até a vida adulta. Este gênero inclui grupos de espécies não-hemolíticas consideradas protótipos dos colonizadores pioneiros das superfícies mucosas e dentárias, como os *Streptococcus mitis*. Entretanto, pouco se sabe ainda sobre o padrão de aquisição inicial e diversidade filogenética de espécies destes grupos. Esse projeto teve como objetivo caracterizar filogeneticamente cepas de *Streptococcus mitis* isoladas de amostras bucais de crianças durante as fases iniciais de colonização bucal. Para isto, os isolados de crianças entre 2 e 16 meses de idade foram cultivados para purificação de DNA genômico e segmentos de genes *housekeeping* foram obtidos através de PCR com *primers* degenerados. Os *amplicons* obtidos foram então seqüenciados e as seqüências submetidas às análises filogenéticas. As seqüências foram comparadas com os dados de seqüenciamento de diversas cepas disponíveis em banco de dados públicos. Os resultados demonstraram que o gênero *Streptococcus* compreende a maior parte dos microrganismos bucais cultiváveis. A diversidade clonal de *S. mitis* pode ser avaliada através de análises das seqüências dos genes constitutivos *sodA* e *ddl*, evidenciando variação clonal desta espécie entre crianças estudadas. Informações importantes para a identificação e análise da diversidade genética de *S. mitis* pioneiras da cavidade bucal foram obtidas, demonstrando que *S. mitis* que colonizam crianças Brasileiras não são filogeneticamente distantes daqueles encontrados em populações estrangeiras.

Palavras Chave: Diversidade genética, Análise filogenética, *Streptococcus* viridans, Microbiota bucal normal, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*

Abstract

There is a highly diverse normal microbiota in the oral cavity. Despite individual variations, *Streptococcus* are among the predominant microorganisms in the oral microbiota from childhood to adulthood. This genus includes species groups considered non-hemolytic prototypes of pioneer colonizers of dental and mucosal surfaces, such as *Streptococcus mitis*. However, little is known about the pattern of initial acquisition and phylogenetic diversity of species in these groups. The objective of this work was to characterize phylogenetically *Streptococcus mitis* isolated from buccal samples of children during earlier stages of oral colonization. Isolates of children between 2 to 16 months of age were cultured for genomic DNA purification and then fragments of two housekeeping genes (*sodA* and *ddl*) were obtained by PCR with degenerate primers. These fragments were sequenced and sequences subjected to phylogenetic analysis. The sequences were compared with sequence data from other *S. mitis* strains available in public databases. The results showed that *Streptococcus* are the principal oral cultivable microorganisms. The clonal diversity of *S. mitis* was determined through analysis of the sequences of the *sodA* and *ddl* sequences, showing clonal variation among the strains of the sampled children. Important information for the identification and analysis of genetic diversity of *S. mitis* were obtained, demonstrating that the oral cavity of Brazilian children is colonized by *S. mitis* that are phylogenetically similar from those that were found in foreign populations.

Keywords: Genetic diversity, phylogenetic analysis, *Streptococcus viridans*, normal oral microbiota, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*.

Sumário

1. Introdução e Revisão de Literatura.....	pg10
2. Proposição.....	pg15
3. Material e Método.....	pg16
4. Resultados.....	pg20
5. Discussão.....	pg39
6. Conclusão.....	pg41
7. Referências.....	pg42
8. Anexos.....	pg46

1. Introdução e Revisão de Literatura

1.1 Taxonomia dos estreptococos não-hemolíticos.

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(5,10). Além do grupo piogênico, o qual inclui espécies patogênicas beta-hemolíticas, cinco grupos incluem diversas espécies comensais alfa- ou gama - hemolíticas da boca e trato respiratório superior. O grupo *viridans* inclui espécies cujas cepas produzem alfa-hemólise em ágar 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. Atualmente o grupo *viridans* inclui cinco grupos: 1) *Mutans*, 2) *Salivarius*, 3) *Anginosus*, 4) *Sanguinis* e 5) *Mitis*[3]. O grupo *Mutans*, com 8 espécies, inclui *S. mutans*, o principal patógeno da cárie detectado exclusivamente em humanos. O grupo *Salivarius* compreende seis espécies, 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* apresenta maior complexidade taxonômica, tendo sofrido diversas modificações nos últimos anos [4]. Análises filogenéticas de 16SrRNA de espécies deste grupo indicam 12 espécies distintas, entre elas, as espécies consideradas comensais em humanos, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. cristatus* e *S. infantis* [5]. Este grupo também inclui a espécie patogênica *S. pneumoniae*. 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. [6,7]. Assim, dentro do grupo *Mitis*, há um subgrupo de espécies com maior similaridade formada pelas espécies *S. mitis*, *S. pneumoniae* e *S. pseudopneumoniae* [7]. A similaridade genética entre espécies do grupo *viridans* torna difícil à identificação destas espécies através de sistemas de caracterização fenotípica ou molecular. Novos sistemas para identificação destas espécies através do sequenciamento de segmentos de genes ubíquos entre estas espécies têm sido desenvolvidos nos últimos anos. Análises taxonômicas de isolados destes grupos

serão fundamentais para a maior compreensão da participação de cada espécie e/ou grupo na ecologia da microbiota normal de humanos.

1.2 Espécies do gênero *Streptococcus* na microbiota normal de humanos.

A cavidade bucal representa uma das superfícies do corpo com maior quantidade e diversidade de microrganismos [8,9]; 23% dos projetos para determinação do microbioma humano (HMP, NIH) são de sítios da cavidade bucal, proporção apenas inferior à dos projetos para determinação da microbiota gastrointestinal (<http://www.hmpdacc-resources.org>). Análises independentes de cultivo indicam que a cavidade bucal de adultos possa abrigar cerca de 700 espécies bacterianas ou filotipos, alguns destes associados com algumas das doenças infecciosas mais comuns em humanos, como a cárie dentária e doença periodontal [10,11]. Entretanto, há ainda pouca informação sobre a composição da microbiota bucal de humanos compatível com a saúde (referida como “microbiota normal”) [12] e sobre seus efeitos na maturação do sistema imunológico adaptativo e susceptibilidade à colonização por patógenos [13]. As principais doenças infecciosas da boca, como a cárie e doença periodontal, são causadas por desequilíbrios ecológicos da microbiota bucal, os quais resultam na emergência de patógenos oportunistas [14,15]. Estes desequilíbrios podem ser causados por fatores ambientais e do hospedeiro, os quais conferem vantagens seletivas a microrganismos com potencial patogênico em relação aos microrganismos comensais [16,17]. A persistência destes 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, incluindo-se endocardite bacteriana, aterosclerose, pneumonia, parto prematuro e diabetes [18,19].

Estudos sobre a composição da microbiota bucal normal têm procurado identificar os principais grupos de microrganismos presentes na maioria dos indivíduos [20–23]. Estes indicam que bactérias do gênero *Streptococcus* apresentam alta frequência e proporção entre pessoas, nos diversos sítios ecológicos da boca incluindo mucosas e biofilme dental. 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 [24] sendo que estes microrganismos predominam durante as primeiras 24h de formação de biofilmes [25]. Espécies de *Streptococcus* dos grupos Mitis e Sanguinis dispõem de diversos componentes de superfície para colonização dos dentes e fornecem novos ligantes para receptores de outras espécies microbianas [26]. Além disto, estas espécies pioneiras modificam as condições ecológicas da microbiota local, viabilizando a colonização por outros gêneros e espécies microbianas [27]. Portanto, as bactérias do gênero *Streptococcus* têm papel importante na determinação da composição da microbiota bucal.

Streptococcus spp. parecem ser importantes estímulos para maturação do sistema imune adaptativo da mucosa [13]. Algumas semanas após o nascimento são detectados anticorpos IgA salivares reativos contra vários antígenos de espécies colonizadoras da boca, como *S. mitis* [28]. A diversidade da especificidade dos anticorpos salivares aumenta significativamente com a erupção dos dentes, por volta dos seis meses de idade [29,30]. Entre os 6 e 12 meses de idade, são detectados mais freqüentemente anticorpos contra a espécie *Streptococcus mutans*, principal patógeno da cárie. Estudos mais recentes indicam que o padrão de especificidade de anticorpos IgA salivares observados aos 6 meses de idade influencia na susceptibilidade à colonização por *S. mutans* [31,32]. Assim, a resposta imunológica induzida pelos colonizadores pioneiros pode promover o desenvolvimento de uma resposta imunológica protetora contra a cárie [13]. Há indícios de que existem grandes variações individuais na composição da microbiota, o que pode estar relacionado com características individuais de resposta imunológica e a variações na intensidade e época de contato com diferentes microrganismos [13,33,34]. Análises da composição e diversidade genética de grupos de microrganismos identificados como componentes comuns da microbiota bucal podem fornecer informações importantes sobre variações individuais nos processos de maturação do sistema imunológico e susceptibilidade a doenças infecciosas bucais. Entretanto, há poucos estudos avaliando a composição e diversidade filogenética de espécies comensais durante as fases iniciais de estabelecimento da microbiota bucal. Análises da diversidade de clones de *S. mitis* em duas crianças de 5 a 10 meses de idade e suas respectivas famílias durante o período de acompanhamento de cerca de 10 meses, indicam que, durante o estabelecimento destes microrganismos na microbiota bucal e respiratória, as

crianças entram em contato com um grande número de clones, mas poucos se estabelecem na microbiota [35].

Projetos de sequenciamento do genoma de diversas espécies comensais de *Streptococcus viridans* iniciados mais recentemente têm gerado informações importantes para a identificação e análise da diversidade genética de espécies comensais da boca e trato respiratório superior e sua relação filogenética com microrganismos patogênicos [7,36,37]. Estes incluem os estudos de determinação dos genomas das cepas *S. sanguinis* SK36 [38], *S. mitis* NCTC 12261 (<http://www.jcvi.org>) e *S. gordonii* Challis substr CH1[39], espécies comuns do biofilme dental e mucosa bucal de humanos (1,4). *Streptococcus* do grupo Viridans são também colonizadoras de outros nichos do organismo humano, como o trato gastrointestinal e trato respiratório superior [40,41], o que sugere um papel muito importante destas bactérias no equilíbrio da microbiota normal de humanos. Pouco se sabe sobre o padrão de colonização inicial e diversidade genética de estreptococos dos grupos Mitis e Sanguinis, embora estes microrganismos serem considerados protótipos dos colonizadores iniciais da boca [42,43]. Isto se deve em parte, à dificuldade para a identificação fenotípica e genética destes microrganismos [44].

1.3 Sistemas de identificação dos grupos e espécies de *Streptococcus Viridans* e análises da diversidade genética.

Os sistemas de classificação de grupos e espécies de *Streptococcus Viridans* com base em análises fenotípicas são extremamente trabalhosos e geralmente geram dados pouco precisos. Análises recentes da eficiência dos sistemas comerciais de identificação fenotípica (*Rapid ID 32 Strep* e *Streptogram*) para a classificação de 148 cepas estreptococos não-hemolíticos representativas de espécies do grupo Viridans (determinadas através do sequenciamento de 4 genes *housekeeping* (*ddl*, *gdh*, *rpoB* e *sodA*), revelam que a porcentagem de classificação correta das espécies através de kits comerciais é inferior a 50% [45]. Entre os genes *housekeeping* estudados para classificação genética, análises de seqüências internas de *sodA* (gene que codifica a superóxido dismutase dependente de manganês) parecem ser as mais discriminativas, sendo suficientes para a classificação da maioria das espécies do grupo Mitis, Anginosus, Salivarius,

Sanguinis e Mutans [46]. Somente a espécie *S.sanguinis* não é identificada adequadamente através das seqüências de *sodA*, uma vez que 73% das cepas desta espécie não geraram *amplicons* com os *primers* degenerados para este gene [47]. Análises das seqüências dos genes *housekeeping ddl*, *gdh*, *rpoB* e *sodA* têm sido superiores às análises das seqüências dos genes *16S rRNA*, as quais não são capazes de discriminar espécies do grupo Mitis (11), uma vez que *16SrRNA* é muito conservado entre estas espécies e porque muitas seqüências de estreptococos depositadas no GenBank para este gene estão identificadas com base em classificações desatualizadas das espécies de *Streptococcus* (9). As seqüências parciais dos genes *ddl*, *gdh*, *rpoB* e *sodA* também são úteis para análise da diversidade genética, sendo utilizados em análises evolutivas (11). Neste projeto, foram utilizados pares de *primers* delineados para *sodA* e *ddl* com base na comparação de seqüências genômicas disponíveis em bancos de dados públicos, previamente validados para diversas populações microbianas (9,11). As seqüências obtidas foram comparadas com bancos de dados disponíveis no GenBank (Números de acesso EU797799 a 798270) e no site da Universidade de Aarhus, Aarhus, Dinamarca (<http://www.immi.au.dk/service/download/kilian>).

2. Proposição

O objetivo geral deste projeto consiste em caracterizar filogeneticamente cepas de *Streptococcus mitis* isoladas de amostras bucais de crianças durante as fases iniciais de colonização bucal.

Para isto, este projeto teve como objetivos específicos:

1 - Sequenciar segmentos dos genes *housekeeping sodA* (codificador da superóxido-dismutase dependente de manganês) e *ddl* (codificador de D-alanina:D-alaninaligase) em isolados clínicos de *Streptococcus mitis* obtidos de amostras de mucosa e placa dental de crianças entre 2 e 16 meses de idade.

2 - Validar, com base nas seqüências gênicas obtidas, a espécie *Streptococcus mitis* previamente determinada através de técnicas de cultivo e rastreamento por PCR espécie-específicos.

3 - Comparar a relação filogenética entre os isolados estudados e entre estes e cepas isoladas de outras populações cujas seqüências de *ddl* e *sodA* estão disponíveis em bancos de dados de acesso público.

3. Material e Métodos

Este projeto foi realizado em conjunto o projeto de Iniciação Científica (FAPESP) intitulado “Análise da colonização bucal de crianças com 2 a 16 meses de idade por espécies não-hemolíticas do gênero *Streptococcus*”, realizado pela aluna do Curso de Graduação em Odontologia, FOP – UNICAMP, **Mariana da Fonseca**. No presente projeto, produtos de PCR de seqüências internas de genes *housekeeping* dos isolados obtidos no projeto relacionado foram seqüenciados, e as seqüências obtidas comparadas com as seqüências de diversas cepas de *Streptococcus* não-hemolíticos isoladas em outros países, disponíveis em bancos de dados públicos.

3.1 Cepas estudadas.

Neste estudo foram incluídas cepas clínicas isoladas de 33 crianças de 2 meses até 16 meses de idade, sendo 6 crianças da faixa etária 2 a 4 meses; 6 crianças da faixa etária de 5 a 7 meses; 8 crianças da faixa etária de 8 a 10 meses; 7 crianças entre as idades de 11 a 13 meses e, por fim, 6 crianças na faixa etária de 14 a 16 meses. As cepas foram isoladas no projeto de Iniciação Científica intitulado “Análise da colonização bucal de crianças entre 2 e 16 meses de idade por espécies não-hemolíticas do gênero *Streptococcus*”, realizado em paralelo pela aluna **Mariana da Fonseca**. Neste último projeto, um total de 3 a 5 isolados de cada tipo morfológico de *Streptococcus* não-hemolítico classificados nos grupos Mitis, Sanguinis, Salivarius, Anginosus e Mutans foram obtidos por criança. A definição de grupos taxonômicos e os *primers* utilizados para esta classificação estão na Tabela 1.

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

Espécies de <i>Streptococcus</i>		Oligonucleotídeo	Tamanho esperado do
Par	Seqüência (5' – 3')	<i>Amplicon</i> [48]	
<i>S. mitis</i>	GA	GTCGAAGGTGATGATATGAC	372
<i>S. oralis</i>		CTGCATTCTGACGCATGACAG	
<i>S. mutans</i>	GB	ATTGAAGGCGAGCCTTTAGAAAG	351
		CAACGATAACAGGATC	
<i>S. salivarius</i>	GC	GCAGCAGTAGCAGAGACGCT	331
		GTCATGACTTCTGCAGGCAC	
<i>S. gordonii</i>	GD	GTCGATGGCGAGGATCTAGAGC	208
<i>S. sanguinis</i>		ACCTCAATCTCGCGAGCCGT	
<i>Milleri group</i>	GE	TGCAGAAGTAGAGGCAAATC	217
		GCCAACTGCTTTTGGCTCCTT	

Um total de 396 isolados foram identificados por PCR com *primers* espécie ou grupo-específico, segundo o sistema proposto por Garnieret *al.* (1997), com algumas modificações. Como controles das reações do PCR, foram utilizadas as cepas *S. sanguinis* SK36, *S. gordonii* Challis substr CH1, *S. salivarius* 0457, *S. oralis* 0670 e *S. mitis* ATCC49456, obtidas da coleção de microrganismos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – Rio de Janeiro.

3.2 Condições de estoque e cultivo dos isolados.

As cepas dos grupos Mitis e Sanguinis foram estocadas como culturas puras a -70°C em *skimmilk*. Estas foram obtidas a partir de amostras de saliva de 4 crianças. Inicialmente, as colônias foram crescidas em meio Mitis Salivarius Agar (MSA) e incubadas por 48h a 37°C com 10% de CO₂. Das culturas puras de MSA, cinco colônias de cada isolado foram transferidas para 25 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) enriquecido com 0,2% extrato de carne e 0,2% de extrato de levedura e incubadas por 18h a 37 °C com 10% CO₂. As células foram coletadas por centrifugação (5 min, 10.000 rpm, 4°C) e armazenadas em *skimmilk*. A pureza

destas culturas foi checada através da análise de esfregaços corados pelo método de Gram.

3.3 Extração de DNA genômico.

As células utilizadas para extração de DNA foram obtidas de culturas obtidas a partir dos estoques congelados. Para isto, aproximadamente 10uL de suspensão estoque em *skim milk* foram removidos com alça e estriados em MSA. Após incubação (37 °C, 10% CO₂, 24h), cinco colônias isoladas foram inoculadas em 25 mL de caldo BHI acrescido de 0,2% de extrato de levedura e 0,2% de extrato de carne, e crescidas sob as mesmas condições, durante 18h.

As células foram coletadas por centrifugação (4 min, 4 °C, ≈3000xg), lavadas com 1 mL de solução salina estéril (NaCl 0.9%) gelada e transferidas a microtubos de 2 mL com tampa de rosca e *o-ring* (Axigen, EUA). Os tubos foram centrifugados (2 min, 4 °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 fenol-clorofórmio. Resumidamente, ao *pellet* bacteriano previamente congelado, foi adicionado solução Tris-EDTA 0.01 M (TE) e SDS 20% e as amostras foram submetidas a uma temperatura de 70°C por 8 min. Depois foram adicionados *beads* para rompimento das células utilizando *obeatbeater* por 1 min a potência máxima e a extração do DNA foi realizada adicionando fenol:clorofórmio:álcoolisoamílico (25:24:1) duas vezes e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) uma vez. As amostras foram tratadas com RNase e incubadas por 40 min. a 40°C. Em seguida, o DNA foi precipitado com acetato de potássio 3M e isopropanol. O DNA foi dissolvido em solução TE 0.01 M pH 8.0, e armazenado em -20°C (5). 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 brometo de etídio 0,15ug/ml, sob luz UV.

3.4 Obtenção dos produtos de PCR dos genes *sodA* e *ddl*.

Fragmentos dos genes *sodA* e *ddl* presentes nas espécies estudadas foram obtidos em reações de PCR com *primers* degenerados (Tabela 2), os quais foram delineados a partir de seqüências de 29 espécies de *Streptococcus* não-hemolíticos

disponíveis em bancos de dados públicos e validados em estudo prévio com 148 isolados (9).

As condições ideais das reações de PCR com *primers* específicos para os genes *sodA* e *ddl* foram padronizadas a partir de amostras de DNA genômico das cepas *S. sanguinis* SK36 e *S. mitis* ATCC49456. Resumidamente, as reações de PCR foram compostas por: 36,25µL de H₂O ultra pura, 5µL de Tampão PCR 10X, 1µL de dNTPs Mix 10mM, 2,5µL de MgCl₂ 50mM, 1,5µL de *Primer Forward* 10µM, 1,5µL de *Primer Reverse* 10µM, 0,25µL de Taq DNA Polimerase e 1µL de *template* (DNA). O ciclo térmico de amplificação da reação consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 5 min., seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 52°C por 30s e extensão a 72°C por 30s, e uma extensão final de 5 min. a 72°C. Os produtos das reações foram analisados em géis de agarose a 1% submetidos à eletroforese (90 V, 40 min.), corados com brometo de etídio (0,15µg/mL) e visualizados sob luz UV através do sistema *Gel Logic 200 Imaging System*.

Produtos obtidos em reações semelhantes a partir do DNA genômico de cepas de *S. mitis* e *S. sanguinis* já identificadas foram purificados utilizando-se o *kit StrataPrep PCR Purification Kit* (Stratagene, EUA) segundo recomendações do fabricante. Depois de purificados, os produtos foram submetidos ao seqüenciamento das duas fitas com os mesmos pares de *primers*.

Tabela 2. *Primers* degenerados para obtenção dos segmentos internos dos genes *sodA* e *ddl* de cepas de *Streptococcus* não-hemolíticos

Gene alvo	Nome do primer	Seqüência (5' – 3')^a	Tamanho esperado do amplicon [50]
<i>sodA</i>	<i>sodA</i>	TRCAYCATGAYAARCACCAT	438
	<i>sodAR</i>	ARRTATTAMGCRTGYTCCCARACRTC	
<i>Ddl</i>	<i>ddlF</i>	GCYATGGATAAAATYACRAC	563
	<i>ddlR</i>	CCACTGGKTRAATCCTGGCAGRGT	

^a Y, C ou T; R, A, ou G; K, G ou T; M, A ou C.

Fonte: Hoshino *et al.* (2005).

4. Resultados

Para a realização do projeto foram coletadas amostras de saliva de 33 crianças obtendo-se no final, 396 cepas isoladas. Todas as cepas foram submetidas à análise por PCR. A Figura 1 mostra produtos de reações de PCR com *primers* espécie – específicos para identificar *S. mitis*.

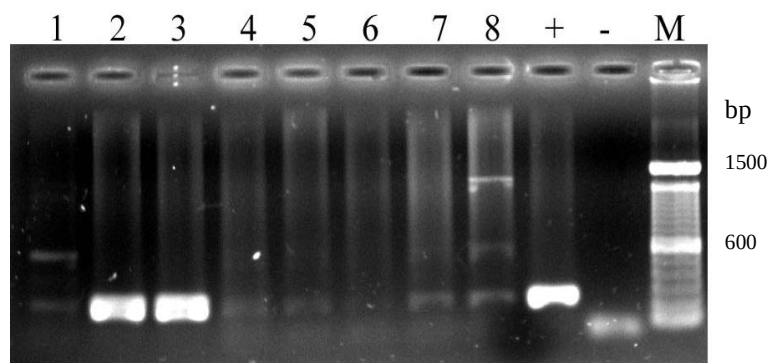


Figura 1. Produtos de reação de PCR para identificar *S. mitis* (produto de 259 pb). M: marcador de peso molecular. +: controle positivo (*S. mitis* ATCC49456). - : controle negativo.

A Figura 2 mostra produtos de reações de PCR com *primers* espécie-específicos para *S. sanguinis*. As três cepas representadas geraram produtos de PCR.

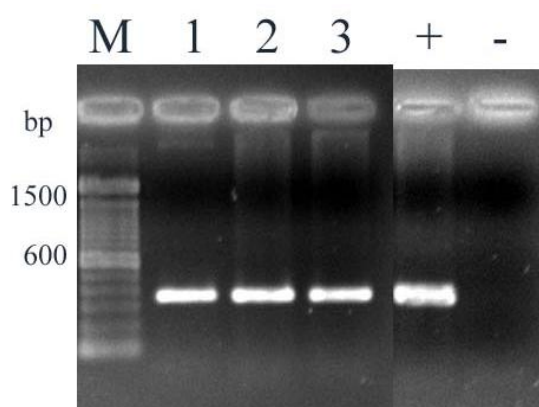


Figura 2. PCR para identificar *S. sanguinis* com o par de *primers* específicos para *S. sanguinis* (produto de 374 pb). M: marcador de peso molecular. +: controle positivo (*S. sanguinis* SK36). -: controle negativo.

Após realização dos ensaios de PCR e identificação, os resultados foram agrupados na tabela 3, que contém as informações gerais sobre a distribuição das

cepas isoladas segundo a faixa etária e as quantidades identificadas pelas análises. A espécie mais prevalente na população foi a *S. salivarius*, correspondendo a cerca de 34% do total das cepas. As espécies *S. mitis* e *S. sanguinis*, que foram selecionadas para agrupamento filogenético, possuíram menor prevalência. *S. mitis* correspondeu a um total de 5% dos isolados identificados, enquanto *S. sanguinis* correspondeu a 1% das cepas.

A distribuição das espécies variou de acordo com o grupo analisado. No Grupo 1, duas cepas (3,6%) foram identificadas como *S. mitis* através de PCR específico através do sistema de identificação por PCR proposto por Garnier et al. (1997) (Tabela 3 e 4). No Grupo 2, também foram identificadas duas cepas como pertencentes à espécie *S. mitis*, que correspondem a um total de 2,9% do total analisado neste grupo (Tabela 3 e 4).

Já no Grupo 3, foi encontrado o maior número de cepas pertencentes à espécie *S. mitis* (n=11), correspondendo a um total de 11,8% do total analisado neste grupo. No Grupo 4 e 5, uma maior diversidade de estreptococos foi encontrada, comparando-se aos grupos anteriores (Tabela 3 e 4). Entretanto, apenas duas cepas foram identificadas como *S. mitis* em cada um dos grupos, correspondendo a um total de 2,1 e 2,4% respectivamente. No Grupo 4 identificamos 3 cepas (3,09% do total) como pertencentes à espécie *S. sanguinis* (Tabela 3 e 4).

Tabela 3. Espécies de *Streptococcus* spp. identificadas 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																																
Primer	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 ^a	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	
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
D	<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	
	<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	
	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	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	
	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

^a Identificação de espécie obtida através de sequenciamento.

Tabela 4. Distribuição das cepas isoladas segundo os grupos etários, número de indivíduos analisados, total de cepas isoladas e espécies selecionadas.

Grupos de crianças	Nº de indivíduos analisados	Nº total de cepas isoladas	<i>S. mitis</i>	<i>S. sanguinis</i>
G1 2-4 meses	6	55	2 (3,6%)	0
G2 5-7 meses	6	69	2 (2,9%)	0
G3 8-10 meses	8	93	11 (11,8%)	0
G4 11-13 meses	7	97	2 (2,1%)	3 (3,09%)
G5 14-16 meses	6	82	2 (2,4%)	0
Total	33	396	19	3

Ao todo, 12 cepas clínicas de *S. mitis* e dois controles de referência (*S. mitis* B6 e *S. mitis* NCTC 12261) foram selecionados para agrupamento filogenético. Para isto, os DNAs genômicos foram submetidos às reações de PCR com primers específicos aos genes *sodA* e *ddl* (Tabela 2) seguindo as condições previamente publicadas (9). O resultado das amplificações é demonstrado na Figura 3. Todas as cepas apresentaram produtos de PCR quando utilizados *primers* para o gene *sodA* (Figura 3, primeira linha). Da mesma forma, todas as cepas apresentaram produtos de PCR quando utilizados primers para o gene *ddl* (Figura 3, segunda linha). Os produtos de PCR foram purificados através do kit *StrataPrep PCR Purification Kit* (Stratagene, EUA) e submetidos ao sequenciamento capilar no Laboratório de Genômica da FOP-UNICAMP.

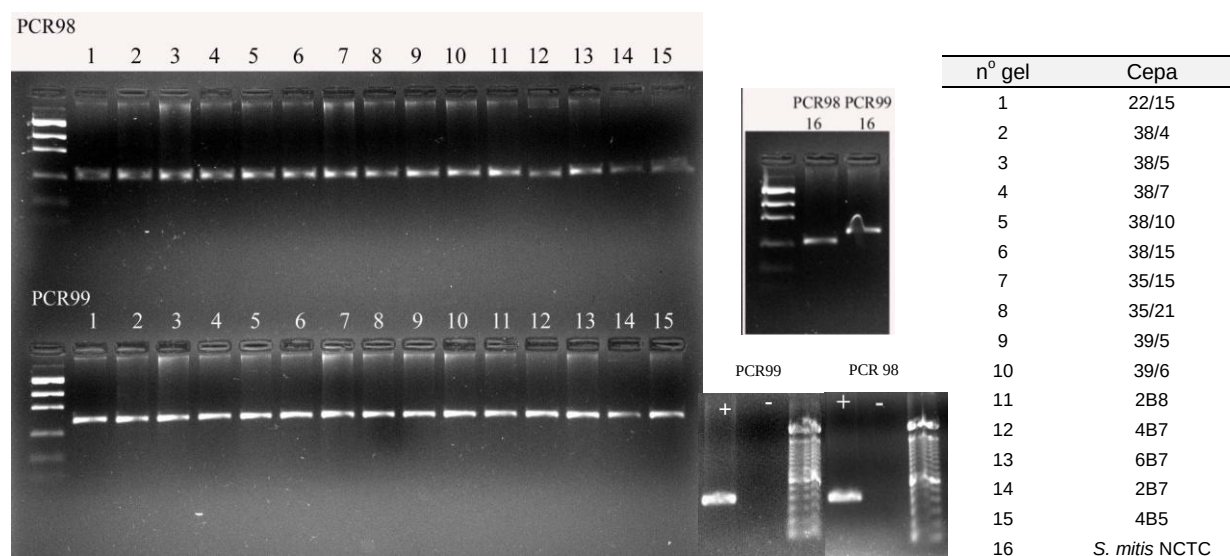


Figura 3: Gel superior (PCR 98): Produtos de amplificação do gene *sodA* para amostras de DNA das respectivas cepas (listadas à direita), sendo todas positivas (produto de 450 bp). Gel inferior (PCR 99): Produtos de amplificação do gene *ddl* para amostras de DNA das respectivas cepas (lista ao lado), sendo todas positivas (produto de 600 bp).+: controle positivo. -: controle negativo das respectivas reações.

Os resultados de sequenciamento foram individualmente avaliados através do programa *Bioedit* versão 7.0 (mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html). Os eletroferogramas gerados foram analisados através deste programa para detecção de problemas de sequenciamento. Após a correção e confirmação das sequências dos genes *sodA* ou *ddl*, estas foram submetidas à análise de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) contra o banco geral de sequências nucleotídicas e contra o banco de sequências genômicas da espécie *S. mitis* (*blastn - refseq_genomic*). Os resultados das análises para *sodA* estão agrupados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultado da análise em BLAST das seqüências gênicas de *sodA* obtidas nas cepas de *S. mitis* clínicas.

Accession	Description	Query coverage	E value	Max ident	Gaps	Cepa	Gru -po	Best Blast Hit
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	100%	0	393/413 (95%)	0/413 (0%)	22/14	G1	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	100%	0	393/413 (95%)	0/413 (0%)	22/15	G1	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	100%	7,E-172	380/413 (92%)	0/413 (0%)	6B/7	G2	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	100%	0	389/413 (94%)	0/413 (0%)	35/15	G3	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	100%	0	392/413 (95%)	0/413 (0%)	35/21	G3	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	100%	3,E-145	360/413 (87%)	0/413 (0%)	38/4	G3	<i>S. parasanguinis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	100%	0	396/413 (96%)	0/413 (0%)	38/5	G3	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	100%	0	395/413 (96%)	0/413 (0%)	38/7	G3	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	100%	0	396/413 (96%)	0/413 (0%)	38/10	G3	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	100%	0	397/413 (96%)	0/413 (0%)	38/15	G3	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	99%	0	391/412 (95%)	0/412 (0%)	2B/8	G4	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	100%	0	397/413 (96%)	0/413 (0%)	39/5	G5	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	100%	0	399/413 (97%)	0/413 (0%)	39/6	G5	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	100%	0	395/413 (96%)	0/413 (0%)	NCTC	-	<i>S. mitis</i>

Todas as seqüências de *sodA* pesquisadas apresentaram melhor similaridade aos respectivos genes da espécie *S. mitis* (*blastn - nr/nt*), exceto a seqüência obtida para a cepa 38/4, cujo melhor alinhamento obtido foi com a espécie *S. parasanguinis* (Tabela 5). As porcentagens de identidade entre as seqüências *sodA* dos isolados com o respectivo gene da cepa *S. mitis* B6 (*refseq_genomic*) variaram de 92% (cepa 6B/7) a 97% (cepa 39/6) (Tabela 5). A cepa 38/4 (com similaridade a *S. parasanguinis*), foi então reavaliada, através da comparação de BLAST com outros genomas de referência nas espécies *Streptococcus parasanguinis* (cepa FW213, *refseq_genomic*) e *Streptococcus oralis* (cepa Uo5, *refseq_genomic*). A Tabela 6 resume os achados, confirmando maior identidade à espécie *S. parasanguinis* (100%, cepa FW213). Assim, é possível que o sistema proposto por Garnier *et. al* (1997) não seja capaz de diferencia as espécies *S. mitis* e *S. parasanguinis*. O sequenciamento do gene 16sRNA da cepas 38/4 será realizado para confirmar estes resultados.

Tabela 6: Análise em BLAST da sequência gênica de *sodA* obtidas na cepa 38/4.

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	<u>Gaps</u>	<u>Cepa</u>
GU907536.1	<i>Streptococcus parasanguinis</i> strain C86 (<i>sodA</i>) gene, partial	100%	0	391/413 (95%)	0/413 (0%)	C86
DQ232576.1	<i>Streptococcus oralis</i> strain CIP 105158 (<i>sodA</i>) gene, partial	96%	1,00E ⁻¹⁷⁹	380/399 (95%)	0/399 (0%)	105158
CP003122.1	<i>Streptococcus parasanguinis</i> FW213, compl.genome	100%	0	388/413 (94%)	0/413 (0%)	FW213
FR720602.1	<i>Streptococcus oralis</i> Uo5 compl. Genome	100%	8,00E ⁻¹³⁹	355/413 (86%)	0/413 (0%)	Uo5

Os resultados das análises de BLAST das sequências de *ddl* estão agrupados na Tabela 7. Com exceção da cepa 38/4, todas as demais sequências apresentaram melhor similaridade à *S. mitis*. A identidade máxima entre estas sequências com a cepa de referência *S. mitis* B6 (*refseq_genomic*) variou de 90% a 94% (Tabela 7). Assim, a identificação em espécie pela técnica de PCR foi validada e confirmada pelas análises de sequenciamento de *sodA* e *ddl* (Tabela 6 e 7).

Tabela 7: Análise em BLAST das sequências gênicas de *ddl* obtidas nas cepas de *S. mitis*.

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	<u>Gaps</u>	<u>Cepa</u>	<u>Grupo</u>	<u>Best Blast Hit</u>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	99%	0	487/539 (90%)	1/539 (0%)	NCTC	-	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	99%	0	486/538 (90%)	0/538 (0%)	22/14	G1	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	100%	0	486/539 (90%)	0/539 (0%)	22/15	G1	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	99%	0	491/538 (91%)	0/538 (0%)	6B/7	G2	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	99%	0	491/538 (91%)	0/538 (0%)	35/15	G3	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	99%	0	503/537 (94%)	0/537 (0%)	35/21	G3	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	99%	0	489/535 (91%)	0/535 (0%)	38/5	G3	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	100%	0	492/538 (91%)	0/538 (0%)	38/7	G3	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	99%	0	492/538 (91%)	0/538 (0%)	38/10	G3	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	99%	0	491/538 (91%)	0/538 (0%)	38/15	G3	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	100%	0	496/536 (93%)	0/536 (0%)	2B/8	G4	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	99%	0	489/538 (91%)	0/538 (0%)	39/5	G5	<i>S. mitis</i>
FN568063.1	<i>Streptococcus mitis</i> B6 compl. genome	100%	0	505/538 (94%)	0/538 (0%)	39/6	G5	<i>S. mitis</i>

As sequências de *sodA* e *ddl* das cepas identificadas como *S. mitis* através das análises de BLAST foram então submetidas a análise de alinhamento utilizando-se os programas Gblocks 0.91b, disponíveis *online* no sítio: <http://www.phylogeny.fr> (27). Os resultados destas análises para o gene estão mostrados na Figura 4.

Gblocks 0.91b Results - sodA

10 20 30 40 50 60
 S. mitis B6 AACCACCATCAAACCTTATGTCAACAATGCTAATGCAGCTCTTAAGAAAAACCCCTGAAATC
 S. mitis NCTC AAGCACCACCAAACCTTATGTCAACAATGCCAATGCAGCTCTTAAGAAAAACCCCTGAAATC
 22/14 AAGCACCACCAAACCTTATGTCAACAATGCCAATGCAGCTCTTGAAAAACATCCTGAAATC
 22/15 AAGCACCACCAAACCTTATGTCAACAATGCCAATGCAGCTCTTGAAAAACATCCTGAAATC
 6B/7 AAGCACCACCAAACCTTATGTCAACAATGCTAATGCAGCTCTTGAAAAACATCCTGAAATC
 35/15 AAGCACCACCAAACCTTATGTCAACAATGCTAATGCAGCTCTTGAAAAACCCCTGAAATC
 35/21 AAGCACCACCAAACCTTATGTCAACAATGCTAATGCAGCTCTTGAAAAACCCCTGAAATC
 38/5 AAGCACCACCAAACCTTATGTCAACAATGCCAATGCAGCTCTTGAAAAACCCCTGAAATC
 38/7 AAGCACCACCAAACCTTATGTCAACAATGCCAATGCAGCTCTTGAAAAACCCCTGAAATC
 38/10 AAGCACCACCAAACCTTATGTCAACAATGCCMATGCAGCTCTTGAAAAACCCCTGAAATC
 38/15 AAGCACCACCAAACCTTATGTCAACAATGCCAATGCAGCTCTTGAAAAACCCCTGAAATC
 2B/8 AAGCACCACCAAACCTTATGTCAACAATGCTAATGCAGCTCTTGAAAAACCCCTGAAATC
 39/5 AAGCACCACCAAACCTTATGTCAACAATGCTAATGCAGCTCTTGAAAAACCCCTGAAATC
 39/6 AAGCACCACCAAACCTTATGTCAACAATGCTAATGCAGCTCTTAAGAAAAACCCCTGAAATC
 ** ***** **

70 80 90 100 110 120

=====+=====+=====+=====+=====+

S.mitis B6
S.mitis NCTC
22/14
22/15
6B/7
35/15
35/21
38/5
38/7
38/10
38/15
2B/8
39/5
39/6

GGTGAAGATCTTGAAAGCCTTGCTTGCTGATGTAGAATCTATCCCAGCTGATATCCGTCAA
GGTGAAGATCTTGAAAGCCTTGCTTGCTGATGTAGAATCTATTCCAGCTGATATCCGTCAA
GGTGAAGA CTTTGAAAGCCTTGCTTGCTGATGTAGAATCTATCCCAGCTGATATCCGTCAA
GGTGAAGA CTTTGAAAGCCTTGCTTGCTGATGTAGAATCTATCCCAGCTGATATCCGTCAA
GC AAGATCTTGAG GCTTTA CTTGCA GATGT TAT TCTATCCCAGCA GATATCCG CAA
GGTGAAGA CTTTGAAAGCTTTGCTTGCTGATGTAGAA WCTATCCCAGCTGATATCCGTCAG
GGTGAAGA CTTTGAAAGCCTTGCTTGCTGATGTAGAATCTATCCCAGCTGATATCCGTCAA
GGTGAAGATCTTGAAAGCCTTGCTTGCTGATGTAGAATCWATTCCAGCTGATATCCGTCAA
GGTGAAGATCTTGAAAGCCTTGCTTGCTGATGTAGAATCTATTCCAGCTGATATCCGTCAA
GGTGAAGATCTTGAAAGCCTTGCTTGCTGATGTAGAATCTATTCCAGCTGATATCCGTCAA
GGTGAAGATCTTGAAAGCCTTGCTTGCTGATGTAGAATCTWATTCCAGCTGATATCCGTCAA
GGTGAAGA CTTTGAAAGCTTTGCTTGCTGATGTAGAATCTATCCCAGCTGATATCCGTCAA
GGTGAAGATCTTGAAAGCTTTGCTTGCTGATGTAGAATCWATCCCCAGCTGATATCCGTCAA

* * * * *

[illegible]

190 200 210 220 230 240

S.mitis B6 CCTGAA AAAAA CAGCTCCTTCAGCAGAACTTGCAGCAGATATCGATGCACATTTGGTTCA

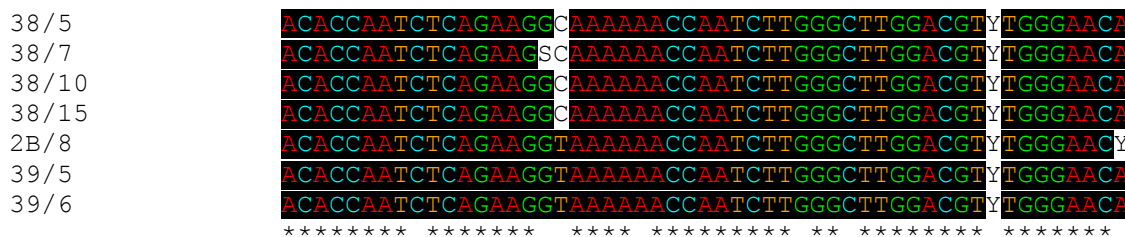
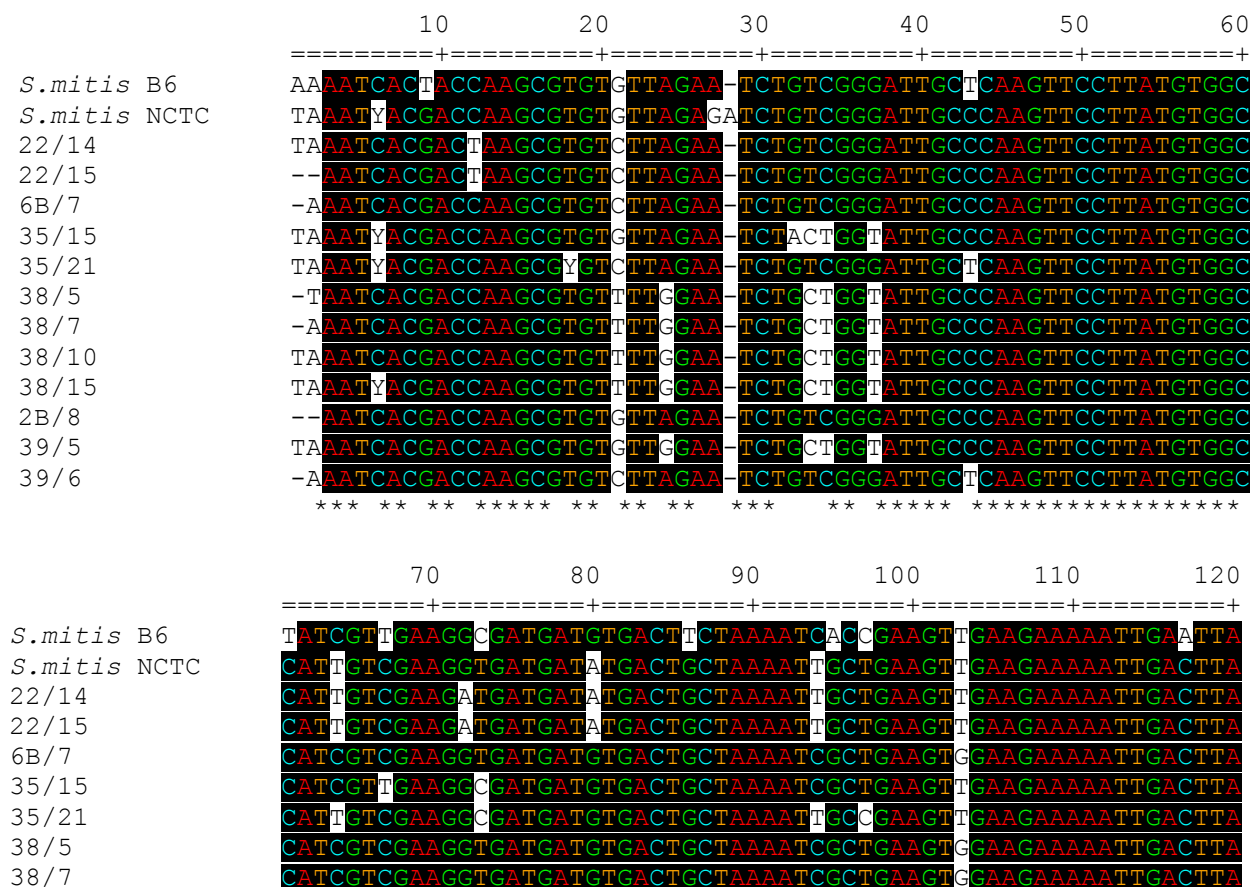


Figura 4. Resultados de alinhamento para as 14 seqüências de *sodA*, espécie *S. mitis*, utilizando o programa MUSCLE 3.7 seguido do refinamento pelo programa Gblocks 0.91b. Nucleotídeos conservados apresentam fundo preto.

Dentre as 14 seqüências de *sodA*, observaram-se segmentos de menor conservação entre as cepas. Uma destas (cepa 6B/7) demonstrou grande variação entre os nucleotídeos das posições 61 a 120. Estas variações parecem ser intrínsecas a cepa, já que o eletroferograma não indicou problema de sequenciamento nestas áreas. Os resultados de alinhamento das 14 seqüências de *ddl*, utilizando-se os mesmos programas, são mostrados na Figura 5.

Gblocks 0.91b Results - *ddl*



38/10 CATCGTCTGAAGGTGATGATGTGACTGCTAAAATCGCTGAAGTGAAGAAAAATTGACTTA
 38/15 CATCGTCTGAAGGTGATGATGTGACTGCTAAAATCGCTGAAGTGAAGAAAAATTGACTTA
 2B/8 TATCGTGAAGGGATGATGTGACTGCTAAAATCGATGAAGTGAAGAAAAATTGACTTA
 39/5 CATCGTCTGAAGGTGATGATGTGACTGCTAAAATCGCTGAAGTGAAGAAAAATTGACTTA
 39/6 CATGTCTGAAGGCATGATGTGACTGCTAAAATTGCCTGAAGTGAAGAAAAATTGACTTA
 ** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

130 140 150 160 170 180
 =====+=====+=====+=====+=====+=====+
S.mitis B6 TCCAGTCTTCACAAAACCATCAAAACATGGGTTCAAGTGTGGTATTTCTAAATCTGAAAA
S.mitis NCTC TCCAGTTTTTCACAAAACCATCTAACATGGGTTCTAGTGTGGTATTTCTAAGTCTGAAAA
 22/14 TCCAGTTTTTCACAAAACCATCTAACATGGGTTCTAGTGTGGTATTTCTAAGTCTGAAAA
 22/15 TCCAGTTTTTCACAAAACCATCTAACATGGGTTCTAGTGTGGTATTTCTAAGTCTGAAAA
 6B/7 TCCAGTTTTTCACAAAACCATCAAAACATGGGTTCTAGTGTGGTATTTCTAAGTCTGAAAA
 35/15 TCCAGTCTTCACAAAACCATCAAAACATGGGTTCAAGTGTGGTATTTCTAAGTCTGAAAA
 35/21 CCCAGTCTTCACAAAACCATCAAAACATGGGTTCAAGTGTGGTATTTCTAAGTCTGAAAA
 38/5 TCCACTTTTCACAAAACCATCAAAACATGGGTTCTAGTGTGGTATTTCTAAATCTGAAAA
 38/7 TCCACTTTTCACAAAACCATCAAAACATGGGTTCTAGTGTGGTATTTCTAAATCTGAAAA
 38/10 TCCACTTTTCACAAAACCATCAAAACATGGGTTCTAGTGTGGTATTTCTAAATCTGAAAA
 38/15 TCCACTTTTCACAAAACCATCAAAACATGGGTTCTAGTGTGGTATTTCTAAATCTGAAAA
 2B/8 TCCAGTCTTCACCTTAAGCGCTCAAAACATGGGTTCTAGTGTGGTATTTCTAAGTCTGAAAA
 39/5 TCCAGTTTTTCACAAAACCATCAAAACATGGGTTCTAGTGTGGTATTTCTAAGTCTGAAAA
 39/6 CCCAGTCTTCACAAAACCATCAAAACATGGGTTCAAGTGTGGTATTTCTAAGTCTGAAAA
 *** * ***** ** ** ** ***** ***** ***** ***** *****

190 200 210 220 230 240
 =====+=====+=====+=====+=====+=====+
S.mitis B6 CCAAGAAGAACTCCGTCAAGCTTTGAACCTTGCCTTCCAATATGACAGCCGTGTCTTGGT
S.mitis NCTC TCAAGAGGAACCTCGTCAAGCTTTGAACCTTGCCTTCCAATATGATAGCCGTGTCTTGGT
 22/14 TCAAGAGGAACCTCCGTCAAGCTTTGAACCTTGCCTTCCAATATGATAGTGTGTCTTGGT
 22/15 TCAAGAGGAACCTCCGTCAAGCTTTGAACCTTGCCTTCCAATATGATAGTGTGTCTTGGT
 6B/7 TCAAGAGGAACCTTCGCAAGCTTTGAACCTTGCCTTCCGATATGACAGTGTGTCTTGGT
 35/15 TCAAGAGGAACCTTCGCAAGCTTTGAACCTTGCCTTCCAATATGACAGCCGTGTCTTGGT
 35/21 TCAAGAGGAACCTCCGTCAAGCTTTGAACCTTGCCTTCCAATATGACAGCCGTGTCTTGGT
 38/5 TCAAGAAGAACTCCGCAAGCTTTGAACCTTGCCTTCCGATATGACAGTGTGTCTTGGT
 38/7 TCAAGAAGAACTCCGCAAGCTTTGAACCTTGCCTTCCGATATGACAGTGTGTCTTGGT
 38/10 TCAAGAAGAACTCCGCAAGCTTTGAACCTTGCCTTCCGATATGACAGTGTGTCTTGGT
 38/15 TCAAGAAGAACTCCGCAAGCTTTGAACCTTGCCTTCCGATATGACAGTGTGTCTTGGT
 2B/8 TCAAGAAGAACTTCGTCAAGCTTTGAACCTTGCCTTCCAATATGACAGCCGTGTCTTGGT
 39/5 TCAAGAGGAACCTTCGCAAGCTTTGAACCTTGCCTTCCGATATGACAGTGTGTCTTGGT
 39/6 TCAAGAGGAACCTCCGTCAAGCTTTGAACCTTGCCTTTCAATATGACAGCCGTGTCTTGGT
 ***** ***** ** ** ** ***** ***** ***** ***** ***** *

250 260 270 280 290 300
 =====+=====+=====+=====+=====+=====+
S.mitis B6 AGAGCAAGGGGTAAATGCCCCGTGAAATCGAGGTTGGTCTCTTGGGCAACTACGATGTCAA
S.mitis NCTC TGAACAAGGGGTAAATGCCCCGTGAAATCGAGGTTGGTCTTACTGGGTAACTACGATGTCAA
 22/14 TGAACAAGGGGTAAATGCCCCGTGAAATCGAGGTTGGTCTTACTGGGTAACTACGATGTCAA
 22/15 TGAACAAGGGGTAAATGCCCCGTGAAATCGAGGTTGGTCTTACTGGGTAACTACGATGTCAA
 6B/7 TGAACAAGGGGTGAATGCCCCGTGAAATCGAGGTTGGTCTCTTGGGTAACTATGATGTCAA
 35/15 AGAGCAAGGGGTGAATGCTCGTGAAATCGAGGTTGGTCTCTTGGGTAACTATGATGTCAA
 35/21 AGAGCAAGGGGTAAATGCTCGTGAAATCGAGGTTGGTCTCTTGGGCAACTACGATGTCAA
 38/5 AGAGCAAGGAATAAATGCCCCGTGAGATAGAGGTTGGTCTACTGGGCAACTACGATGTCAA
 38/7 AGAGCAAGGAATAAATGCCCCGTGAGATAGAGGTTGGTCTACTGGGCAACTACGATGTCAA
 38/10 AGAGCAAGGAATAAATGCCCCGTGAGATAGAGGTTGGTCTACTGGGCAACTACGATGTCAA
 38/15 AGAGCAAGGAATAAATGCCCCGTGAGATAGAGGTTGGTCTACTGGGCAACTACGATGTCAA
 2B/8 AGAGCAAGGGGTAAATGCCCCGTGAAATCGAGGTTGGTCTACTAGGCAACTACGATGTCAA
 39/5 AGAGCAAGGAATAAATGCCCCGTGAAATCGAGGTTGGTCTCTTGGGTAACTATGATGTCAA
 39/6 AGAGCAAGGGGTAAATGCTCGTGAAATCGAGGTTGGTCTCTTGGGCAACTACGATGTCAA
 ** ***** ** ***** ***** ** ** ***** ***** ***** **

	310	320	330	340	350	360
<i>S.mitis</i> B6	AAGCACGCTTCCAGGGAAGTAGTCAAGGATGTTGCCTTTTATGACTACGATGCCAAGTA					
<i>S.mitis</i> NCTC	AAGCACGCTTCCAGGAGAAGTAGTTAAGGATGTTGCCTTTTATGACTATGATGCCAAGTA					
22/14	AAGCACGCTTCCAGGAGAAGTAGTTAAGGATGTTGCCTTTTATGACTATGACGCTAAGTA					
22/15	AAGCACGCTTCCAGGAGAAGTAGTTAAGGATGTTGCCTTTTATGACTATGACGCTAAGTA					
6B/7	GAGCACGCTTCCAGGAGAAGTAGTGTCAAGGATGTTGCCTTCTACGACTATGACGCCAAGTA					
35/15	GAGTACGCTAACCAGGAGAAGTAGTCAAGGATGTTGCCTTTTATGACTACGATGCCAAGTA					
35/21	GAGTACGCTAACCAGGAGAAGTAGTCAAGGATGTTGACTTTTATGACTACGATGCCAAGTA					
38/5	AAGCACGCTTCCAGGGAAGTAGTCAAGGATGTTGCCTTTTATGACTACGATGCCAAGTA					
38/7	AAGCACGCTTCCAGGGAAGTAGTCAAGGATGTTGCCTTTTATGACTACGATGCCAAGTA					
38/10	AAGCACGCTTCCAGGGAAGTAGTCAAGGATGTTGCCTTTTATGACTACGATGCCAAGTA					
38/15	AAGCACGCTTCCAGGGAAGTAGTCAAGGATGTTGCCTTTTATGACTACGATGCCAAGTA					
2B/8	AAGCACGCTAACCAGGAGAAGTAGTCAAGGATGTTGCCTTTTATGACTACGATGCCAAGTA					
39/5	GAGCACGCTTCCAGGAGAAGTAGTGTCAAGGATGTTGCCTTCTACGACTATGATGCCAAGTA					
39/6	GAGTACGCTAACCAGGAGAAGTAGTCAAGGATGTTGACTTTTATGACTACGATGCCAAGTA					
	** ** *					

	370	380	390	400	410	420
<i>S.mitis</i> B6	TATTGACAACAAGATTACCATGGATATCCCAGCCAAAATCAGTGATGATGTAGTGGCTGT					
<i>S.mitis</i> NCTC	TATTGATAACAAGATTACCATGGATATCCCAGCTAAAATCAGTGATGATGTGGTAGCTGT					
22/14	TATTGATAACAAGATTACCATGGATATCCCAGCTAAAATCAGTGATGATGTGGTAGCTGT					
22/15	TATTGATAACAAGATTACCATGGATATCCCAGCTAAAATCAGTGATGATGTGGTAGCTGT					
6B/7	TATTGATAACAAGATTACCATGGATATCCCAGCTAAAATCAGTGATGATGTGGTAGCTGT					
35/15	TATTGACAACAAGATTACCATGGATATCCCAGCTAAAATCAGTGATGATGTGGTAGCTGT					
35/21	TATTGACAACAAGATTACCATGGATATCCCAGCTAAAATCAGTGATGATGTGGTAGCTGT					
38/5	TATTGACAACAAGATTACCATGGATATCCAGCCAAAATTAGTGATGATGTGGTAGCTGT					
38/7	TATTGACAACAAGATTACCATGGATATCCAGCCAAAATTAGTGATGATGTGGTAGCTGT					
38/10	TATTGACAACAAGATTACCATGGATATCCAGCCAAAATTAGTGATGATGTGGTAGCTGT					
38/15	TATTGACAACAAGATTACCATGGATATCCAGCCAAAATTAGTGATGATGTGGTAGCTGT					
2B/8	TATTGACAACAAGATTACCATGGATATCCCAGCTAAAATCAGTGATGATGTGGTAGCTGT					
39/5	TATTGATAACAAGATTACCATGGATATCCCAGCTAAAATCAGTGATGATGTGGTAGCTGT					
39/6	TATTGACAACAAGATTACCATGGATATCCCAGCTAAAATCAGTGATGATGTGGTAGCTGT					
	* *					

	430	440	450	460	470	480
<i>S.mitis</i> B6	CATGCGTCAAAATGCAGAAACAGCCTTTCGTGCCATTGGCGGTCTCGGTCTCTCTCGTTG					
<i>S.mitis</i> NCTC	CATGCGTCAGAATGCAGAAACAGCCTTCCGTGCTATTGGTGGTTTAAAGTCTATCTCGTTG					
22/14	CATGCGTCAGAATGCAGAAACAGCCTTCCGTGCCATTGGTGGCCTCGGTCTCTCTCGTTG					
22/15	CATGCGTCAGAATGCAGAAACAGCCTTCCGTGCCATTGGTGGCCTCGGTCTCTCTCGTTG					
6B/7	CATGCGTCAAAATGCAGAAACAGCCTTCCGTGCCATTGGTGGCCTCGGTCTCTCTCGTTG					
35/15	CATGCGTCAAAATGCAGAAACAGCCTTTCGTGCCATTGGTGGACTCGGTCTCTCTCGTTG					
35/21	CATGCGTCAGAATGCAGAAACAGCCTTCCGTGCCATTGGTGGCCTCGGTCTCTCTCGTTG					
38/5	CATGCGTCAAAATGCAGAAACAGCCTTCCGTGCCATTGGTGGCCTCGGTCTCTCTCGTTG					
38/7	CATGCGTCAAAATGCAGAAACAGCCTTCCGTGCCATTGGTGGCCTCGGTCTCTCTCGTTG					
38/10	CATGCGTCAAAATGCAGAAACAGCCTTCCGTGCCATTGGTGGCCTCGGTCTCTCTCGTTG					
38/15	CATGCGTCAAAATGCAGAAACAGCCTTCCGTGCCATTGGTGGCCTCGGTCTCTCTCGTTG					
2B/8	CATGCGTCAAAATGCAGAAACAGCCTTCCGTGCCATTGGTGGTCTCGGTCTCTCTCGTTG					
39/5	CATGCGTCAAAATGCAGAAACAGCCTTCCGTGCCATTGGTGGCCTCGGTCTCTCTCGTTG					
39/6	CATGCGTCAGAATGCAGAAACAGCCTTCCGTGCCATTGGTGGCCTCGGTCTCTCTCGTTG					
	* *					

	490	500	510	520	530	540
<i>S.mitis</i> B6	CGATTTCTTCTATACAGATTAAGGGAGAGATTTTCCTAAACGAGCTGAATACCAATGCCAGGT-					
<i>S.mitis</i> NCTC	TGAATTTCTTCTATACAGATTAAGGGAGAGATTTTCCTAAACGAGCTCAATACTCTGCCAGGC-					
22/14	CGATTTCTTCTATACATGAATTAAGGGAGAGATTTTCCTAAATGAGCTCAATACCTGCCAGGC-					
22/15	CGATTTCTTCTATACATGAATTAAGGGAGAGATTTTCCTAAATGAGCTCAATACCTGCCAGGYT					
6B/7	CGATTTCTTCTATACAGACAAGGGAGAGATTTTCCTAAACGAGCTTAATACCTGCCAGGC-					

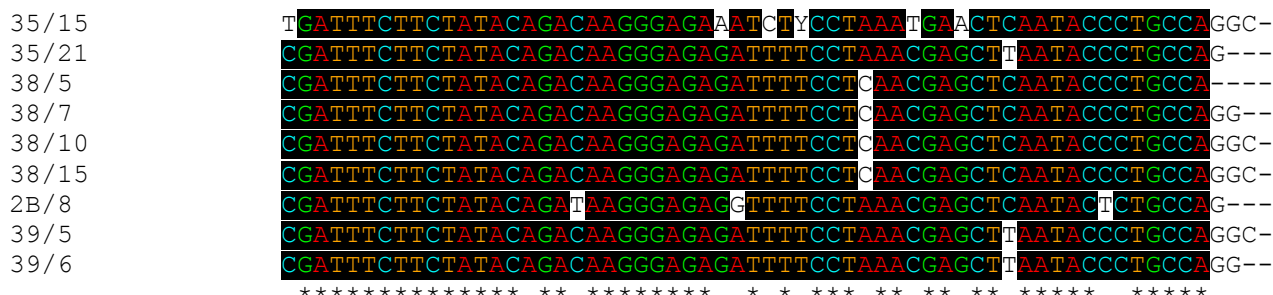


Figura 5. Resultados de alinhamento das 14 seqüências de *ddl*, utilizando o programa MUSCLE 3.7 seguido do refinamento pelo programa Gblocks 0.91b. Nucleotídeos conservados apresentam fundo preto.

Nenhuma das cepas demonstrou variações significativas como identificado para a seqüência de *sodA* da cepa 6B/7. Uma vez alinhadas, as seqüências foram submetidas aos programas *PhyML* 3.0 para análise da filogenia e *TreeDyn* e construção de dendograma (Figura 6).



Figura 6. Fluxograma das análises das seqüências de *sodA* ou *ddl* de 14 isolados *S. mitis* (27).

Em uma primeira análise, todas as seqüências de *sodA* foram comparadas entre si com a presença das amostras de referência *S. mitis* B6 e *S. mitis* NCTC 12261 (Figura 7).

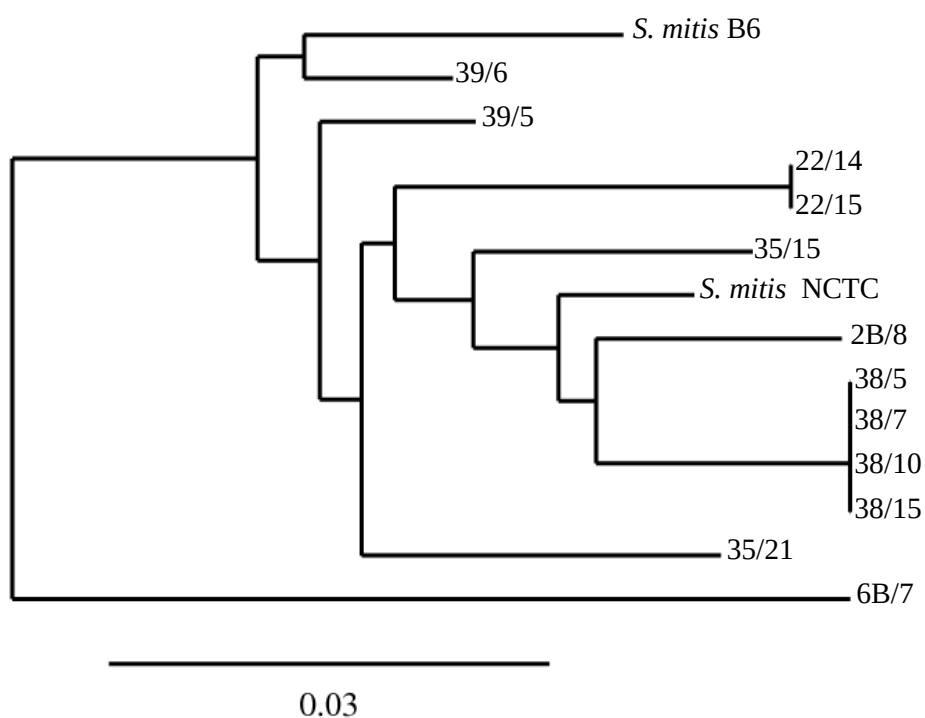


Figura 7: Relações filogenéticas entre as cepas de *S. mitis* baseadas na análise das seqüências de *sodA*.

O dendograma das seqüências de *sodA* demonstra diversidade filogenética entre os isolados (Figura 7). Cepas isoladas de um mesmo paciente demonstram ter maior proximidade filogenética como, por exemplo, as cepas isoladas do voluntário 38 (cepas /5, /7, /10 e /15) e voluntário 22 (cepas /14 e /15) (Figura 7), sugerindo que os isolados derivam de um mesmo clone. Análise do padrão de restrição de cromossoma destes isolados poderiam auxiliar na confirmação desta hipótese. Por outro lado, foram também identificados isolados de um mesmo paciente com maior distância filogenética, como observado nas amostras 35/15 e 35/21 e nas amostras 39/5 e 39/6 (Figura 7). Como esperado, a cepa 6B/7 mostrou-se distante das demais cepas analisadas, confirmando as análises visuais do alinhamento das seqüências de *sodA* (Figuras 4 e 7). A relação entre as seqüências de *ddl* foram comparadas entre si e com as cepas referência *S. mitis* B6 e *S. mitis* NCTC 12261 (Figura 8).

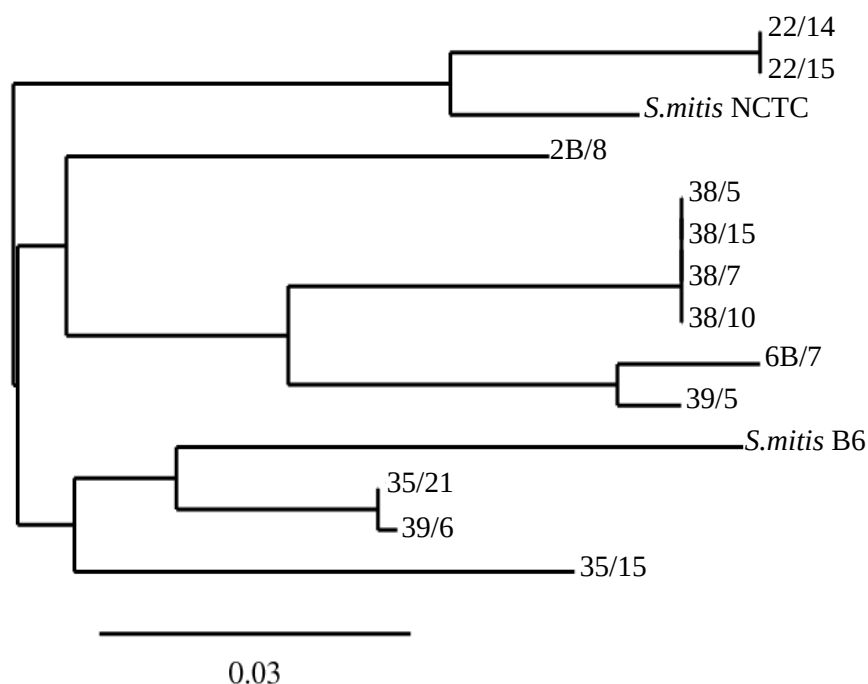


Figura 8: Relações filogenéticas entre as cepas de *S. mitis* baseadas na análise das sequências de *ddl*.

O dendograma baseado nas seqüências de *ddl* confirma a diversidade entre as cepas analisadas (Figura 8). Assim como observado nas análises das seqüências de *sodA*, algumas cepas isoladas de um mesmo paciente demonstram ter maior proximidade filogenética (cepas 38/5, 38/7, 38/10, 38/15 e cepas 22/14, 22/15). Outras cepas isoladas de um mesmo paciente demonstram distância filogenética, como já observado nas análises das seqüências de *sodA* (amostras 35/15, 35/21 e 39/5, 39/6) (Figuras 7 e 8). A cepa 6B/7, distante das demais nas análises das seqüências de *sodA*, nas análises das seqüências de *ddl* mostrou-se semelhante às demais cepas analisadas (Figura 8).

Em uma análise mais abrangente, todas as seqüências de *sodA* disponíveis nos bancos de dados do GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/batchentrez?db=Nucleotide> e <http://www.immi.au.dk/service/download/kilian> (11) foram comparadas com as seqüências de *sodA* das amostras identificadas em nosso estudo, além dos controles-referência *S. mitis* B6 e *S. mitis* NCTC 12261 (Figura 9).

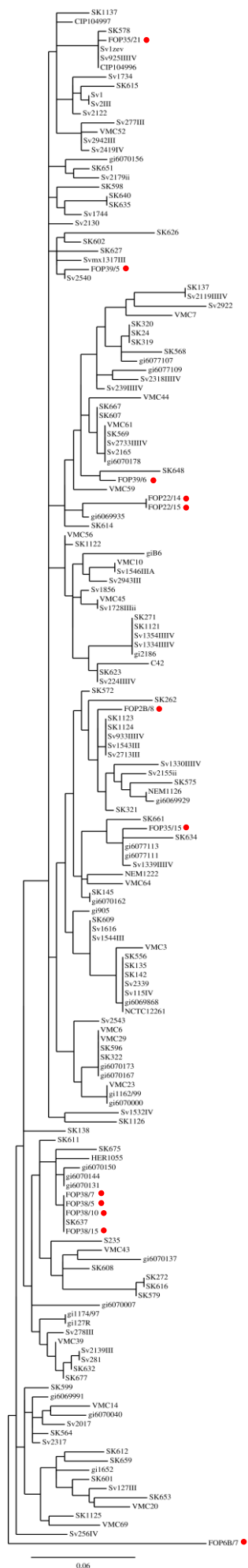


Figura 9: Relações filogenéticas entre todas as seqüências de *sodA* disponíveis nos bancos de dados do GenBank e (11) e amostras identificadas em nosso estudo.

O dendograma destas relações filogenéticas com base em sequências *sodA* demonstra que as cepas isoladas em nosso trabalho distribuíram-se ao longo do agrupamento filogenético contendo amostras provenientes de outros países (Figura 9). Não foi observando nenhum padrão de agrupamento para as amostras isoladas de crianças Brasileiras. A cepa 6B/7, foi a cepa com menor similaridade à todas as sequências dos bancos de dados.

As cepas isoladas de um mesmo paciente que demonstraram ter maior proximidade filogenética nas análises anteriores, assim continuaram, mesmo quando analisadas em conjunto com as sequências dos bancos de dados- (Figura 9).

Assim como feito para *sodA*, todas as sequências de *ddl* disponíveis nos bancos de dados do GenBank e (11) foram comparadas com as sequências de *ddl* das amostras identificadas em nosso estudo, incluindo os controles-referência *S. mitis* B6 e *S. mitis* NCTC 12261 (Figura 10).

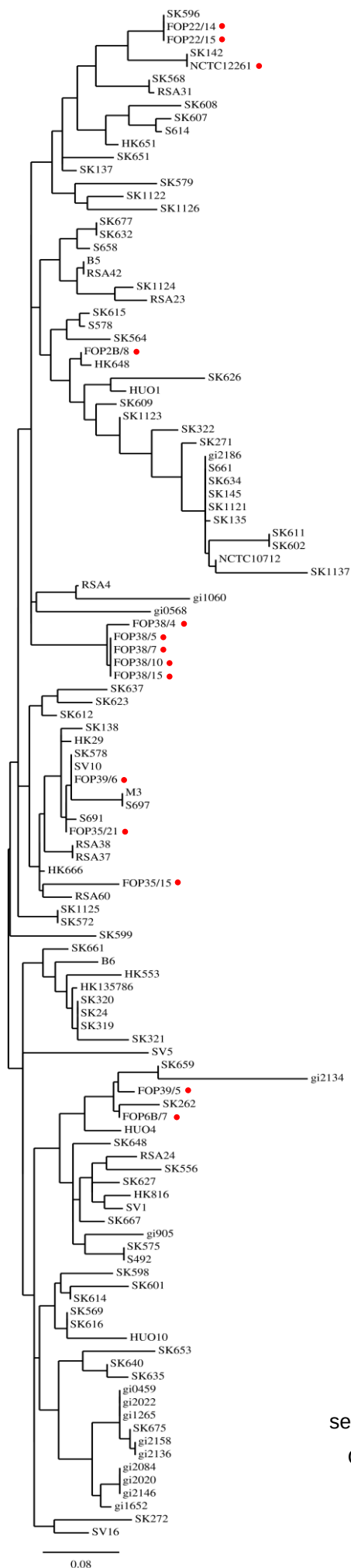


Figura 10: Relações filogenéticas entre todas as sequências de *ddl* disponíveis nos bancos de dados do GenBank e (11) e amostras identificadas em nosso estudo.

O dendograma filogenético demonstra que as cepas isoladas em nosso trabalho distribuíram-se ao longo do agrupamento filogenético contendo amostras provenientes de outros países (Figura 10). Não foi observando nenhum padrão de agrupamento para as amostras isoladas de crianças Brasileiras. (Figura 10).

5. Discussão

O corpo humano com sua microbiota constitui o "superorganismo humano", sendo que diversas funções fisiológicas e imunológicas humanas dependem de sua microbiota comensal (2). A microbiota comensal se estabelece imediatamente após o nascimento e desenvolve-se em ecossistemas complexos característicos dos nichos diversos presentes nas superfícies das membranas mucosas e da pele. Em geral, a microbiota comensal nos diversos nichos bucais inclui um grupo central de microrganismos que se mantém de forma relativamente estável durante toda a vida de um indivíduo (2). Estudos transversais e longitudinais com foco na população de *S. mitis* em neonatos e lactentes demonstraram que existem vários genótipos desta espécie no trato respiratório de cada indivíduo (28, 29). Dos múltiplos genótipos presentes em recém-nascidos ao longo de um período de um ano, apenas alguns foram isolados em mais de uma ocasião (29). Em adultos, há o mesmo grau de diversidade clonal, mas aparentemente há uma maior estabilidade clonal (28). Três hipóteses foram consideradas para explicar a origem dos clones múltiplos que parecem ser adquirido ao longo do tempo por crianças e adultos (28). Primeiro, a aquisição contínua ao longo do tempo a partir de contatos próximos pode contribuir para o processo. Entretanto, o compartilhamento de genótipos *S. mitis* entre membros da família e sujeito do estudo, parece não ser o principal fator (2, 28, 29). Segundo, o aparecimento frequente de novos genótipos em um indivíduo, como resultado de recombinação homóloga dentro do *pool* de estreptococos que co-existem na cavidade bucal, parece ser uma hipótese razoável, já que *S. mitis* são naturalmente competentes. Entretanto, esta hipótese não é suportada por dados experimentais (28). Terceiro, a presença de diferentes clones de *S. mitis* em diferentes nichos do trato respiratório superior e boca parece ser a explicação mais plausível (28). Em apoio a esta teoria, estudos demonstram que, além da grande diversidade clonal, clones de diferentes nichos podem ser transmitidos para novos sítios do hospedeiro (2,29). Apesar do baixo número de *S. mitis* isolados em nosso estudo, foi possível observar em dois voluntários a presença de um único clone, enquanto que em outros dois voluntários, de duas amostras isoladas, havia dois genótipos distintos (Figuras 7 e 8). Métodos de identificação e avaliação clonal, baseados em metodologias independentes de cultura, parecem acessar mais profundamente a real diversidade clonal da espécie *S. mitis* (2). As flutuações

observadas na abundância de clones individuais de *S. mitis* em nosso estudo e em inúmeros estudos (2, 28, 29) parecem ser devidas às interações dentro da complexa microbiota bucal, cuja composição precisa ser mais estudada (2).

6. Conclusões

- 1) Bactérias do gênero *Streptococcus* compreendem a maior parte dos microrganismos bucais cultiváveis na amostra estudada.
- 2) É possível acessar a diversidade clonal de *Streptococcus mitis*, através de análises das sequências dos genes *sodA* e *ddl*.
- 3) Há variação clonal entre isolados de *Streptococcus mitis* entre crianças.
- 4) *Streptococcus mitis* que colonizam crianças brasileiras não são filogeneticamente distintos daqueles encontrados em populações estrangeiras.

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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Facklam, R. 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin.Microbiol.Rev.* 15:613-630.
6. 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.
7. 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.

8. 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.
9. Hoshino, T., T. Fujiwara, and M. Kilian. 2005. Use of phylogenetic and phenotypic analyses to identify nonhemolytic streptococci isolated from bacteremic patients. *J. Clin. Microbiol.* 43:6073-6085.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Marsh, P. D. 2003. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 149:279-294.
15. 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.

16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Paster, B. J., I. Olsen, J. A. Aas, and F. E. Dewhirst. 2006. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol.2000.* 42:80-87.
20. 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.
21. Smith, D. J., W. F. King, and M. A. Taubman. 1990. Salivary IgA antibody to oral streptococcal antigens in predentate infants. *Oral Microbiol.Immunol.* 5:57-62.
22. Smith, D. J. and R. O. Mattos-Graner. 2008. Secretory immunity following mutans streptococcal infection or immunization. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 319:131-156.

23. Vickerman, M. M., S. Iobst, A. M. Jesionowski, and S. R. Gill. 2007. Genome-wide transcriptional changes in *Streptococcus gordonii* in response to competence signaling peptide. J.Bacteriol. 189:7799-7807.

24. Xu, P., J. M. Alves, T. Kitten, A. Brown, Z. Chen, L. S. Ozaki, P. Manque, X. Ge, M. G. Serrano, D. Puiu, S. Hendricks, Y. Wang, M. D. Chaplin, D. Akan, S. Paik, D. L. Peterson, F. L. Macrina, and G. A. Buck. 2007. Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis*. J.Bacteriol. 189:3166-3175.

25. Ruoff, K. L. 2002. Miscellaneous Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci: Emerging Opportunists. Journal of Clinical Microbiology 40:1129-1133.

26. 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

27. Dereeper A.*, Guignon V.*, Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard J.F., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie J.M., Gascuel O. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res. 2008 Jul 1;36(Web Server issue):W465-9. Epub 2008 Apr 19.

28. Hohwy, J., J. Reinholdt, and M. Kilian. 2001. Population dynamics of *Streptococcus mitis* in its natural habitat. Infect. Immun. 69:6055–6063.

29. Kirchherr, J. L., G. H. Bowden, D. A. Richmond, M. J. Sheridan, K. A. Wirth, and M. F. Cole. 2005. Clonal diversity and turnover of *Streptococcus mitis* bv. 1 on shedding and nonshedding oral surfaces of human infants during the first year of life. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12:1184–1190.

8. ANEXO



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 filogenética de cepas Streptococcus dos grupos Mitis e Sanguinis isolados da cavidade bucal de crianças durante as fases iniciais de colonização"**, protocolo nº 054/2010, dos pesquisadores Renata de Oliveira Mattos Graner e Jéssica Dias Theobaldo, 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 **"Phylogenetic diversity of the genus Mitis and Sanguinis isolated from young infants oral cavity"**, register number 054/2010, of Renata de Oliveira Mattos Graner and Jéssica Dias Theobaldo, 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.

VISUALIZAÇÃO DE DESPACHO

Processo	2010/06785-1
Linha de Fomento	Programas Regulares / Bolsas / No País / Iniciação Científica - Fluxo Contínuo
Situação	Em Execução
Vigência	01/07/2010 a 30/06/2012
Beneficiário	Jessica Dias Theobaldo
Responsável	Renata de Oliveira Mattos Graner
Vínculo Institucional do Processo	Faculdade de Odontologia de Piracicaba/FOP/UNICAMP

Folha de Despacho

Datas do Despacho

Emitido em / por:	27/09/2012	Andrea Faria Saraiva
--------------------------	------------	----------------------

Objetos de análise

Objeto de análise	Data de Submissão	Resultado
Relatório Científico 4	19/07/2012	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), 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**

O relatório apresentado está muito bem elaborado e os resultados apresentados respondem às perguntas do objetivo e metodologia. O relatório está bastante satisfatório e considero o mesmo aprovado

Resultado

Aprovado

Frases para Termo de Outorga

Não há frases associadas.

Relatório Científico 4 (Aprovado)

Compromisso	10/07/2012
Período Relacionado	10/12/2011 a 30/06/2012
Situação	Atendido