

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA INTEGRADA

PAULA MORIGI GRANERO

DIVERSIDADE GENOTÍPICA DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* EM CRIANÇAS ATENDIDAS EM UM PROGRAMA
EDUCATIVO-PREVENTIVO

MARINGÁ
2013

PAULA MORIGI GRANERO

DIVERSIDADE GENOTÍPICA DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* EM CRIANÇAS ATENDIDAS EM UM PROGRAMA EDUCATIVO-PREVENTIVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Odontologia Integrada - Universidade Estadual de Maringá-UEM, como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof.a Dr.a Marina de Lourdes Calvo Fracasso

Maringá
2013

DIVERSIDADE GENOTÍPICA DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* EM CRIANÇAS ATENDIDAS EM UM PROGRAMA
EDUCATIVO-PREVENTIVO

Trabalho de dissertação apresentado à UEM – Universidade Estadual de Maringá,
Centro de Ciências da Saúde, programa de pós-graduação em odontologia como
requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia com nota final
igual a _____, conferida pela Banca Examinadora formada pelas professoras:

Prof^a. Dr^a. Marina de Lourdes Calvo
Fracasso

1^a Examinadora Presidente

Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Regina Célia Poli-Frederico

2^a Examinadora

Universidade Norte do Paraná

Prof^a. Dr^a. Carina Gisele Costa Bispo

3^a Examinadora

Universidade Estadual de Maringá

Maringá, 20 de fevereiro de 2014

AGRADECIMENTOS

A **Deus** Senhor absoluto da minha vida e minha história, que ousou apostar em mim confiando-me mais este talento.

Aos **meus pais**, que acreditaram e apoiaram minha decisão neste caminho trilhado na doação e no amor.

Ao **meu grande amor Fábio**, que com muito carinho me apoiou incondicionalmente.

A **minha irmã Patrícia**, que com seu exemplo de garra, determinação e dedicação me ensinou a ir em frente e nunca desistir.

Aos **meus avós**, que sempre me deram alento frente aos grandes desafios vivenciados.

A **professora Marina de Lourdes Calvo Fracasso** por ter apostado e confiado em mim, instruindo-me a tempo e a contra tempo, sem medir esforços para o aprimoramento desse trabalho. À você, professora, muito obrigada.

A professora **Regina Célia Poli-Frederico**, que sabiamente me orientou na realização deste trabalho e ofereceu-me todas as condições necessárias sua realização.

A professora **Sandra Mara Maciel**, que com todo empenho e determinação se dedicou para o delineamento e finalização do estudo.

A **todos os professores** do curso que sempre agiram com equilíbrio e sensatez frente às inúmeras ocasiões, inimagináveis, geradas em decorrência de minha inexperiência e por terem fundamental parcela no meu processo de aprendizado durante estes dois anos.

A todos os que participaram direta ou indiretamente neste meu processo de formação, meus votos de afeto e gratidão.

GRANERO, Paula Morigi. Diversidade genotípica de *Streptococcus Mutans* em crianças atendidas em um programa educativo-preventivo. 34f [Dissertação de Mestrado]. Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada – Universidade Estadual de Maringá, 2014.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genotípica dos isolados de *S. mutans* em pré-escolares, atendidas em um programa educativo-preventivo, no setor público, implementado desde o primeiro ano de vida. Para seleção da amostra foram utilizados os dados dos prontuários das crianças, selecionando-se 21 crianças, com idade entre 2 a 7 anos, dentição decídua completa e que possuíam ao menos três fatores de risco à cárie. Destas selecionou-se 12 crianças livres de cárie (grupo 1) e 9 crianças com experiência de cárie (grupo 2). Em seguida, a saliva foi coletada e posteriormente foram realizados os testes laboratoriais, por meio da reação em cadeia da polimerase com *primers* arbitrários (AP-PCR), caracterização pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), quanto a diversidade genotípica, analisando-se 210 isolados coletados. Os dados foram analisados estatisticamente por meio do Modelo de Regressão Logística Simples. Observou-se que dentre as crianças livres de cárie, 58,22% tinham idade entre 4 e 5 anos, 75% do gênero masculino e 66,67% apresentaram um genótipo. Já dentre as crianças com presença de cárie 44,44% tinham entre 6 e 7 anos de idade, 66,67% do gênero masculino e 77,78% apresentaram dois ou mais genótipos. Houve correlação positiva da diversidade genotípica com a cárie dentária (OR =7, IC 95%:0,969-50,567). No entanto, não houve correlação da diversidade genotípica dos *S. mutans* com a idade e o gênero das crianças. Os dados do presente estudo permitem concluir que crianças com cárie apresentaram maior número de genótipos, confirmando a correlação da diversidade genotípica com a cárie dentária, portanto há necessidade da implementação de medidas preventivas individualizadas para crianças de alto risco, bem como, estudos longitudinais monitorando a produção de mutacinas pelo *S. mutans*.

Palavras chave: *Streptococcus mutans*. Diversidade genotípica. Criança. *Primers* arbitrários.

GRANERO, Paula Morigi. Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* in children attending an educative-preventive program. 34f [Dissertação de Mestrado]. Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada – Universidade Estadual de Maringá, 2014.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the genotypic diversity of isolates of *S. mutans* in preschoolers, attended by an preventive educational program, in the public sector, implemented since the first year of life. For the sample assortment was resorted data from medical records of the children, selecting 21 of them, with age between 2-7 years, complete primary dentition and that had at least three risk factors for dental caries. Of these group was selected 12 caries-free children (group 1), and 9 infants that already have caries experience (group 2). After this selection, the saliva was collected and then were performed the laboratory tests using the polymerase chain reaction with random primers (AP- PCR), analyzing 210 isolates collected. The data were statistically analyzed, employing the Logistic Regression Model. It was observed that among the caries-free children, 58.22 % were between 4 and 5 years, 75 % were male and 66.67 % had just one genotype. In the other hand, among the infants with dental caries, 44.44 % were 6 - 7 years old, 66.67 % were males and 77.78 % had two or more genotypes. There was a positive correlation between the genotypic diversity and dental caries (OR = 7, 95 %:0,969 - 50, 567). However, there was no correlation of genotypic diversity of *S. mutans* with age and gender of children. The data from this study support the conclusion that preschoolers with caries had a higher number of genotypes, corroborating the interconnection between genotypic diversity and tooth caries. So it must be implemented preventive measures, individualized to the high-risk children, as well it is necessary longitudinal studies that monitor the mutacinas produced by *S. mutans*.

Key words: *Streptococcus mutans*. Genotypic diversity. Children. Arbitrary primer.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 *Primers* para PCR específica para o gene *da glicosiltransferase* de *S. mutans*
- Tabela 2 Descrição das variáveis qualitativas em estudo por presença ou não presença de cárie e os respectivos resultados do modelo de regressão logística simples

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPO-D	Dentes cariados, perdidos e obturados na dentição permanente
S.mutans	<i>Streptococcus Mutans</i>
S.sobrinus	<i>Streptococcus sobrinus</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
AP-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com <i>Primers</i> Arbitários
ceo-d	Dentes cariados, perdidos e obturados na dentição decídua
AMSB	Ágar mitis salivarius adicionado de sacarose, bacitracina e telurito de potássio
MSB	Mitis Salivarius Bacitracina
BHI	Brain Heart Infusion
Pb	Pares de Base
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
OR	Odss Ratio Bruto
DNA	Ácido desoxirribonucléico
TE	Tris-HCl
MLEE	Eletroforese de enzima multilocus
ATP-ase	Proteína carreadora ou transportadora de membrana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo geral.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4 ARTIGO.....	17
4.1 INTRODUÇÃO.....	17
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.2.1 Delineamento experimental e elegibilidade da população	18
estudo.....	
4.2.2 Etapa clínica, isolamento de <i>S. mutans</i> e identificação da	19
linhagem	
4.2.3 Extração simplificada de DNA cromossômico	
bacteriano.....	19
4.2.4 Identificação por meio da PCR de <i>S. mutans</i>.....	20
4.2.5 Genotipagem por AP-PCR	21
4.2.6 Análise Estatística.....	21
4.3 RESULTADOS.....	21
4.4 DISCUSSÃO.....	22
5 CONCLUSÕES.....	26

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem-se observado uma tendência de queda nos índices de cárie dentária no Brasil e em outros países, muito embora, permaneça como um grande problema de Saúde Pública, na maior parte do mundo. Em levantamento recente, realizado no Brasil, identificou-se que crianças com idade de até 5 anos possuem em média pelo menos 2 dentes com cárie, ressaltando o componente 'c' (cariado) responsável por 80% do índice ceo-d (índice de dentes decíduos cariados, extraídos e obturados) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). A saúde bucal precária tem um efeito profundo na saúde geral e qualidade de vida das pessoas (PETERSEN et al., 2005). Em populações com baixa prevalência dessa doença, a incidência de lesões em um grupo restrito, vem evidenciando o fenômeno de polarização da cárie dentária. Desta forma, a literatura mostra uma tendência de estabilização na experiência de cárie à custa de uma minoria de indivíduos bastante suscetíveis.

Os *S. mutans* têm sido intensamente estudados (LI e CAUFIELD, 1995; NAPIMOGA et al., 2005; PIERALISI et al., 2010; ZHOU et al., 2011; CHEON et al., 2013) em função de serem considerados os agentes etiológicos primários da cárie dentária (HAMADA; SLADE, 1980; LOESCH, 1986). Estudos sobre os fatores virulência dos *S. mutans* e sua correlação com outras espécies são fundamentais para entender a colonização de diferentes genótipos no mesmo indivíduo (NAPIMOGA et al., 2005). Vários estudos têm demonstrado que a cavidade bucal abriga genótipos distintos na saliva e no biofilme dentário (NAPIMONGA et al., 2005; ZHOU et al., 2011; CHEON et al., 2013). Além disso, demonstram que os genótipos podem diferir na virulência (LEMBO et al., 2007) o que pode alterar a sua capacidade de colonizar e predominarem em um ambiente específico. Em um ambiente de alta cariogênicidade, genótipos de *S. mutans* podem apresentar características de virulência que aumentam a capacidade deste microrganismo de colonizar a cavidade bucal. AP-PCR tem sido amplamente utilizado para discriminar esta diversidade genotípica (LI e CAUFIELD, 1998; MOSER et al., 2009; OHO et al., 2000; TABACHOURY et al., 2008; GAMBOA et al., 2010; JIANG et al., 2012). A técnica demonstrou-se um recurso importante para a genotipagem dos isolados, obtendo-se 100% de aproveitamento na análise das amostras (SAARELA et al., 1996; ALALUUSUA et al., 1996; LI e CAUFIELD, 1998).

A colonização da cavidade bucal por um elevado número de genótipos de *S. mutans* tem sido correlacionada com o aumento da prevalência de cárie (EMANOELSON et al., 2003;

NAPIMOGA et al., 2005) possivelmente como resultado da simultânea atividade de vários genótipos com diferentes potencias cariogênicos em um único local (ALALUUSUA et al., 1991). Apesar de muitos estudos detectarem *S. mutans* no biofilme dentário, saliva e em lesões cariosas de praticamente todos os indivíduos com alta, média e até baixa prevalência (JIANG et al., 2012; ZHOU et al., 2005), e confirmarem a correlação da diversidade genotípica com a da prevalência da doença cárie (ZHOU et al., 2005; NAPIMOGA et al., 2005; PIERALISI et al., 2010; GAMBOA et al., 2010.; ZHOU et al., 2011; ARTHUR et al., 2011; JIANG et al., 2012; CHEON et al., 2013), ainda não se conhece a razão e o porquê dentro de um mesmo programa educativo/preventivo, implementado desde o primeiro ano de vida e fundamentado na educação dos pais para o cuidado domiciliar em relação a bons hábitos de higiene e alimentar, bem como no atendimento profissional bimestral com profilaxia profissional e aplicação tópica de fluoretos, ainda assim, em algumas crianças observa-se o desenvolvimento de lesão de cárie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Napimoga avaliou a diversidade genotípica e a dos isolados de *S. mutans* de 8 crianças livres de cárie (total =155 isolados) e 8 crianças com cárie-ativa (total = 144 isolados). Os isolados foram obtidos a partir de amostras da saliva, placa dentária e superfície da língua e foram identificados pela PCR. Os isolados foram submetidos a AP-PCR e eletroforese de enzima multilocus (MLEE) para estabelecer a diversidade genotípica. Produção de glucano insolúvel em água (WIG) (monitorizada por SDS -PAGE), o pH final das culturas e a capacidade de células bacterianas para aderirem em vidro liso na presença de sacarose também foram medidos. Os resultados mostraram uma diferença significativa (P, 0,01) no número de genótipos quando grupos livres de cárie e cárie-ativas foram comparados por ambos os métodos de impressão digital utilizados. PH Final (P $\frac{1}{4}$ 0,32) e o percentual de adesão a um superfície de vidro (P $\frac{1}{4}$ 0,62) não mostraram diferenças entre os dois grupos, no entanto, as intensidades de bandas WIG do grupo de cárie ativas foram maiores do que os do grupo livres de cárie (P, 0,01). Além disso, WIG foi positivamente correlacionada com a capacidade do *S. mutans* em aderir a um superfície de vidro (r $\frac{1}{4}$ 0,34, P = 0,02) de cáries ativas assuntos. Estes dados mostraram que a análise de AP – PCR e MLEE ambos são métodos eficazes para avaliar a relação genética de *S. mutans* com a cárie dentária. Utilizando estas técnicas, verificou-se que existe um maior número de genótipos de *S. mutans* com aumento da capacidade de sintetizar WIG em indivíduos cárie-ativa (NAPIMOGA et al., 2005)

Lembo et al. (2010), através da saliva estimulada, e biofilme da superfícies dentária, isolaram um total de 339 *S. mutans* de 10 crianças livres de cárie e 11 crianças com cárie. Os isolados de *S. mutans* foram genotipados pela AP-PCR. Um isolado de cada genótipo foi testado quanto à sua susceptibilidade ácida e a sua capacidade para formar biofilme. Cinquenta e um genótipos distintos foram encontrados, um a três genótipos em cada amostra, sendo que um único genótipo foi detectado em sete indivíduos. Não houve diferenças significativas no número de genótipos encontrado nas crianças livres de cárie e cárie-ativa. Não houve correlação entre o número de genótipos e os níveis salivares de *S. mutans*. Cinco dos seis genótipos encontrados no biofilme foram obtidos a partir de crianças cárie-ativa, embora as diferenças na formação do biofilme entre isolados de crianças livres de cárie e cárie-ativa não foram estatisticamente significantes. Os genótipos com baixa

suscetibilidade a desafio ácido foram estatisticamente mais frequentes entre os isolados de crianças cárie-ativas do que entre as crianças livres de cáries.

Liu et al. (2010), compararam a produção de ácido orgânico de diferentes genótipos de *S. mutans* a partir de placa dentária de crianças com idade de 3 a 5 anos, com diferentes experiências de cárie dentária. A quantidade de ácido orgânico, incluindo o ácido fórmico, ácido acético e ácido láctico, produzidos por genótipos diferentes de *S. mutans*, foram medidos por cromatografia gasosa. Os autores observaram que há diferença significativa na capacidade das cepas com genótipos diferentes para produzir ácido orgânico. Os autores concluíram que, quanto mais genótipos distintos, maior capacidade em produzir ácido orgânico.

Pieralisi et al. (2010), avaliaram a diversidade genotípica de *S. mutans* em pré-escolares livres de cárie e com cárie-ativa. Participaram do estudo vinte e oito crianças com idade entre 4 e 5 anos de idade, advindas de famílias de baixo nível socioeconômico e com estilo de vida, dieta, e hábitos de higiene bucal similares. A amostra foi composta por um grupo de crianças frequentadoras de uma creche de médio porte, localizada em uma cidade do sul do Brasil. Todas as crianças ficavam no berçário, durante 5 dias por semana, 8 horas por dia e foram avaliadas, quanto a presença de cárie, pelo índice ceo-d (dentes decíduos cariado, extraídos e obturados). O DNA de 280 isolados de *S. mutans* foi extraído. Os resultados encontrados mostraram que há maior quantidade de genótipos de *S. mutans* no grupo de crianças com experiência de cárie em relação ao grupo de crianças sem cárie. Das crianças que apresentaram cárie dentária, 13 apresentaram de 2 a 5 genótipos. Já as crianças livres de cárie, apenas 4 apresentaram 2 genótipos.

Cheon et al. (2011), realizaram um estudo de follow-up com o objetivo de determinar um número mínimo de isolados de *S. mutans*, quando se avalia a diversidade genotípica. Os isolados de *S. mutans* foram genotipados através da AP-PCR. Inicialmente, foram analisados 20 isolados de cada indivíduo, resultando em uma média de 1,6 e 2,4 genótipos em crianças (N = 12) e adultos (N = 10), respectivamente. Posteriormente, novas análises foram feitas com amostras adicionais de 35 crianças e 10 adultos. Essas amostras foram analisadas com um número menor de isolados de cada indivíduo, isto é, 7 a 10 isolados, resultando em uma média de 1,5 genótipos para ambos os grupos. Através do teste Exato de Fisher, pode-se concluir que não houve diferença estatisticamente significativa em se trabalhar com 20 isolados ou 7-10 isolados de *S. mutans*, no entanto, a análise de dados sugerem que o

tamanho das amostras de 7-10, seja um número suficiente de isolados de jovens (ou seja, as crianças neste estudo).

Com o propósito de investigar a diversidade genotípica dos *S. mutans* e *S. sobrinus* em crianças com cárie severa de primeira infância e crianças livres de cárie, Zhou et al. (2011), avaliaram 178 crianças, cooperativas, com idade 3-4 anos pertencentes a creches urbanas localizadas próximo a Pequim, China. A saliva estimulada de 87 crianças com cárie severa de primeira infância e de 91 crianças livres de cárie coletada. Essas salivas foram submetidas ao cultivo e as colônias de *S. mutans* e *S. sobrinus* foram isoladas. A análise genotípica foi realizada através da AP-PCR. Os resultados mostraram que existe de 1 a 5 genótipos colonizados na cavidade bucal, sendo que 85,5% das crianças com cárie e 57,9% das crianças sem cárie abrigaram mais de um genótipo de *S. mutans*. Também foram detectados de 1 a 3 genótipos de *S. sobrinus* na cavidade bucal onde 31,2% das crianças com cárie apresentaram mais de um genótipo de *S. mutans* e apenas 1 genótipo foi encontrado em crianças livres de cárie.

Com o objetivo de investigar os isolados de *S. mutans* em crianças com e sem cárie dentária, utilizando o AP-PCR, Gamboa et al. (2010), realizaram um estudo observacional transversal, incluindo 1203 crianças de 5 anos de idade (75 com e 45 sem cárie dentária) participantes de uma instituição pré-escolar, em Bogotá (Colômbia). *S. mutans* foram isolados de 15 das 45 crianças sem cárie dentária (33,3%) e de 31 das 75 crianças com cárie (41,33 %). Nas 46 crianças, foram identificadas 69 cepas de *S. mutans*: 24 isolados de 15 crianças sem cárie e 45 isolados em 31 crianças com cárie dentária. Com o método de AP-PCR, foram identificados 27 diferentes genótipos: 22 para o grupo de com cárie dentária e 9 do grupo livre de cárie. Em conclusão, houve uma grande diversidade de genótipos de *S. mutans* na população estudada.

Arthur et al. (2011), estudaram a diversidade genotípica de isolados de *S. mutans* retirados no biofilme dental forma *in vivo* sob exposição a sacarose, bem como sua capacidade acidogênica e acidúrica. Para formação do biofilme, os indivíduos lavavam a boca com água destilada ou solução de sacarose 8 vezes ao dia, durante 3 dias. Os genótipos foram avaliados quanto a sua capacidade de reduzir o pH através da glicólise, sua susceptibilidade ácida e atividade F-ATPase. A maioria dos indivíduos abrigavam apenas um genótipo na saliva, que foi detectado em quase todas as amostras de biofilme em proporção elevadas. Os genótipos isolados apenas na presença de sacarose foram mais acidogênicos do que os isolados só na presença de água. Os genótipos a partir do biofilme formado com

sacarose tiveram uma atividade mais acidúrica após 30 e 60 minutos de incubação a pH 2,8 e 5,0, respectivamente. Os resultados sugerem que os biofilmes formados em condições de alta cariogenicidade podem abrigar genótipos de *S. mutans* mais acidúricos e acidogênicos.

Palmer et al. (2012), com o objetivo de identificar cepas de *S. mutans* que predominavam, mesmo após uma terapia reparadora. Coletaram a placa de 7 crianças, acometidas pela cárie precoce da infância, antes e após a terapia reparadora. Foram isolados 828 cepas de *S. mutans* e posteriormente foram submetidos a PCR e AP-PCR. Até 39 linhagens genótípicas de *S. mutans* e *S. sobrinus* foram identificadas pela AP-PCR. Antes do tratamento foram encontrados 3-7 cepas de *S. mutans* em cada paciente. Seis meses pós-terapia esse número diminuiu para 1-2 cepas dominantes de *S. mutans* na maioria dos pacientes. Portanto, a terapia reparadora pode diminuir o número de cepas específicas na cavidade bucal, com o surgimento de cepas dominante após 6 meses do tratamento.

Em 2012, Holbrook e Mangnúsdóttir realizaram um estudo para demonstrar as diferenças fenotípicas de isolados de *S. mutans* de indivíduos com e sem cárie dentária. Cepas de *S. mutans* foram coletados regularmente de sujeitos de diferentes idades a partir dos 4 anos até à idade adulta como parte de um de uma série de projetos de pesquisa que visa avaliação do risco de cárie. Foram isoladas 38 cepas de *S. mutans*, sendo 24 indivíduos com cárie dentária ativa e 14 livres de cárie dentária. As cepas foram analisadas quanto a capacidade adesão a hidroxiapatita; descalcificação da hidroxiapatita; atividade bacteriocina. Os resultados do estudo revelaram que cepas isoladas *S. mutans* de indivíduos com cárie aderem significativamente mais a hidroxiapatita do que cepas isoladas de *S. mutans* de indivíduos livres de cárie e ainda, isolados de *S. mutans* de indivíduos com cárie liberam significativamente mais cálcio da hidroxiapatita do que comparado à cepa isolada de indivíduos sem cárie. Ressaltam também que cepas isoladas de indivíduos com cárie-ativa apresentam maior atividade bacteriocina contra outros isolados de *S. mutans* do que cepas isoladas de indivíduos livres de cárie.

Com o propósito de identificar o número e a distribuição de genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* isolados de crianças livres de cárie dentária e cárie dentária-ativos, Jiang et al. (2012), coletaram saliva não estimulada de 14 estudantes da Universidade de Estomatologia de Wuhan. *S. mutans* e *S. sobrinus* foram isolados utilizando Chelex-100 e foram identificados pela morfologia das colônias e características bioquímicas. Os isolados de *S. mutans* foram genotipados através da AP-PCR. Um total de 516 isolados de *S. mutans* foram genotipados e 44 diferentes genótipos foram determinados. Todos os indivíduos livres de

cárie dentária abrigaram *S. mutans*, mas não *S. sobrinus*, embora 2 indivíduos não tivessem *S. mutans* na saliva. O valor da unidade formadora de colônias de *S. mutans* em superfícies cariadas foi máxima, e os valores em saliva, fissura e superfícies oclusais foram maiores em indivíduos cárie dentária-ativos do que em indivíduos livres de cárie. O valor da unidade formadora de colônias de *S. mutans* nas superfícies cariadas foi significativamente mais elevado do que na saliva e superfícies vestibulares ($p = 0,001$, $P = 0,009$). A colonização de *S. mutans* e *S. sobrinus* foram 96,43 e 7,14%, respectivamente, em cárie dentária-ativos, já nos indivíduos livres de cárie dentária foram 90,8 e 0 %, respectivamente. Os valores do CPOD foram consideravelmente maiores em indivíduos cárie dentária-ativos do que em indivíduos livres de cárie dentária, e houve uma diferença estatisticamente significativa. Estes resultados indicam que os indivíduos cárie dentária - ativos têm maior incidência de portar *S. mutans* e *S. sobrinus* do que indivíduos livres de cárie.

Através de um estudo de coorte longitudinal, Cheon et al. (2013), avaliou a diversidade, semelhança e a estabilidade genotípica dos *S. mutans* associados à cárie dentária. Participaram do estudo 67 crianças de 5 e 6 anos de idade. Como critério de inclusão a criança deveria apresentar alto risco a cárie. Para realização da genotipagem dos *S. mutans* por meio da AP PCR, foram recolhidas amostras de placa dentária dos primeiros molares recém irrompidos, de cada criança. As crianças também receberam profilaxia dentária, aplicação de fluoreto (5% de fluoreto de verniz de sódio), e orientação de higiene bucal, individualmente. Esses procedimentos foram repetidos a cada 6 meses, durante 3 anos, resultando em total de e 4392 isolados de *S. mutans*. Para cada criança foi anotado os índice ceo-d, no mesmo dia da coleta. No início do estudo 18 genótipos distintos, de 67 crianças (diversidade), foram encontrados entre 911 isolados de *S. mutans* e 13 genótipos foram compartilhados por pelo menos duas crianças (semelhança). O número de genótipos por indivíduo foi associados positivamente com a porcentagem de superfícies cariadas no início do estudo. No período de acompanhamento, vinte e quatro das 39 crianças, mantiveram um genótipo predominante (estabilidade) e foi negativamente relacionado com porcentagem de superfícies cariadas. A diversidade observada, em comum, e a estabilidade genotípica dos *S. mutans* representam um padrão de epidemiologia da cárie dentaria nesta comunidade de alto risco a cárie, o que sugere que menos superfícies danificadas são significativamente associadas com menor diversidade e maior estabilidade de genótipos de *S. mutans*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a diversidade genotípica de *S. mutans* em crianças livres de cárie e com experiência de cárie atendidas em um programa educativo-preventivo, no município de Maringá-PR.

3.2 Objetivos específicos

Investigar a diversidade genotípica em isolados de *S. mutans* pela AP-PCR.

4 ARTIGO

Diversidade genotípica de *Streptococcus Mutans* em crianças atendidas em um programa educativo-preventivo

Paula Morigi Granero¹, Regina Célia Poli- Frederico², Sandra Mara Maciel^{1,2}, Marina de Lourdes Calvo Fracasso¹

¹ Universidade Estadual de Maringá-Pr

² Faculdade de Odontologia do Norte do Paraná

4.1 INTRODUÇÃO

Entre as bactérias bucais, os *estreptococos* do grupo *mutans* (*S. mutans* e *S. sobrinus*) foram identificados como o agente etiológico primário associado à iniciação de cárie dentária em seres humanos, considerando que, o principal agente etiológico da cárie dentária em humanos é atribuído ao *S. mutans* (HAMADA e SLADE, 1980; LOESCHE, 1986; TANZER, LIVINGSTON, THOMPSON, 2001; HOLBROOK e MANGNÚSDÓTTIR, 2012). Como um meio de compreender a natureza infecciosa da cárie dentária, o conceito de diversidade foi introduzido. A "diversidade" refere-se ao número de genótipos (ou fenótipos, isto é, tipos de bacteriocina) pertencentes ao indivíduo. A cavidade bucal abriga diferentes genótipos de *S. mutans* na saliva e da placa dentária, com pelo menos 52 genótipos conhecidos (NAPIMOGA et al., 2005; TABCHOURY et al., 2008). Alguns genótipos de *S. mutans* podem ter capacidade de colonizar, preferencialmente, alguns ambientes bucais específicos (NAPIMOGA et al., 2005; SVENSÄTER et al., 1997). Indivíduos com alta e baixa prevalência de cárie dentária podem reter cepas *S. mutans* que apresentam diferenças distintas na virulência e na promoção da atividade de cárie (BANAS, 2004; LIU et al., 2010; HOLBROOK; MANGNÚSDÓTTIR, 2012). A coexistência e a concorrência da virulência de vários genótipos

¹ Artigo planejado para submissão ao periódico *International Journal of Pediatric Dentistry*.

de *S. mutans* nos indivíduos podem servir como determinantes importantes para o aumento da cárie dentária, bem como o sucesso ou insucesso do tratamento desta doença.

Muitos métodos de genotipagem foram utilizados para determinar a diversidade genética de *S. mutans*, incluindo reação em cadeia da polimerase com *primers* arbitrários AP PCR (LI e CAUFIELD, 1995; GAMBOA et al., 2010; JIANG et al., 2012, CHEON et al., 2013). Recentemente, genótipos de *S. mutans* também foram avaliados com este sistema (CHEON et al., 2013; MOSER et al., 2010; PALMER et al., 2012), demonstrando sua utilidade e consistência na identificação de genótipos únicos.

Apesar de muitos estudos detectarem *S. mutans* no biofilme dentário, saliva e em lesões cariosas de praticamente todos os indivíduos com alta, média e até baixa prevalência (ZHOU et al., 2005; HOLBROOK e MANGNÚSDÓTTIR, 2012; JIANG et al., 2012) , ainda não se conhece a razão e o porquê dentro de um mesmo programa educativo/preventivo, implementado desde o primeiro ano de vida e fundamentado na educação dos pais para o cuidado domiciliar em relação a bons hábitos de higiene e alimentar, bem como no atendimento profissional bimestral com profilaxia profissional e aplicação tópica de fluoretos, ainda assim, em algumas crianças observa-se o desenvolvimento de lesão de cárie.

O objetivo do presente trabalho será verificar a diversidade genotípica de *S. mutans* em crianças livres de cárie e com experiência de cárie atendidas em um programa educativo-preventivo, no município de Maringá-PR.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Delineamento experimental e elegibilidade da população de estudo

A população do estudo foi composta por crianças de 2 a 7 anos atendidos no setor público que frequentavam mensalmente o programa educativo/preventivo desde o primeiro ano de vida. Para seleção da amostra foi realizada uma análise detalhada da totalidade dos prontuários das crianças desde o primeiro ano de vida, selecionando-se 21 crianças que apresentavam ao menos três fatores de risco a cárie dentária, (anexo 2) no momento da pesquisa e dentição decídua completa. Destas selecionou-se 12 crianças livres de cárie (grupo 1) e 9 crianças com experiência de cárie (grupo 2).

Este projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e à apreciação da Secretaria de Saúde de Maringá, PR. Os responsáveis legais das crianças foram esclarecidos sobre a natureza do trabalho e também sobre a necessidade da obtenção de uma autorização, de acordo com o Código de Ética Profissional e orientações contidas na Resolução 196 de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, para pesquisas envolvendo seres humanos. Após explicação a respeito dos riscos e benefícios dos procedimentos, todos os envolvidos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido autorizando, portanto, a realização do exame bucal e coleta de saliva.

4.2.2 Etapa clínica, isolamento de *S. mutans* e identificação da linhagem

A estimulação da saliva foi feita pela mastigação, durante 1 minuto, de uma película de parafilme. Durante a mastigação, foi recomendado à criança para não engolir a saliva ou a película de parafilme. A coleta das amostras de saliva foi efetuada pelo método da espátula de madeira, descrito por Köhler e Bratthall (1979). Resumidamente este consiste no seguinte: cerca de 30 mm da ponta de uma espátula de madeira 150 x 130 mm foram introduzidos na boca da criança e pressionados 10 vezes (5 vezes de cada lado), sobre o dorso da língua. Ao retirar a espátula, foi pedido à mesma para fechar os lábios, sem encostar os dentes, para reter o excesso de saliva da espátula. Imediatamente após a coleta, cada lado da espátula foi pressionado de maneira a tangenciar na superfície de ágar mitis salivarius adicionado de sacarose, bacitracina e telurito de potássio (AMSB) (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973; TORRES et al., 1993) distribuído em placas do tipo Rodac® 67x15 mm (Inlab – Interlab Distribuidora de produtos Científicos Ltda, São Paulo, SP). O material foi incubado na estufa a 37°C, durante 48 horas em jarras de anaerobiose. Com auxílio de microscópio estereoscópico (Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, SP), foram retiradas 10 colônias suspeitas de pertencerem aos *S. mutans* desenvolvidas na superfície do ágar MSB (mitis salivarius bacitracina). Cada colônia foi transferida para um microtubo contendo caldo BHI (brain heart infusion) e foram incubadas por 24h em jarras de anaerobiose com chama de vela a 37°C. As culturas de bactérias isoladas foram submetidas à extração de DNA.

4.2.3 Extração simplificada de DNA cromossômico bacteriano

As células bacterianas crescidas em meio BHI foram centrifugadas por aproximadamente 10 minutos a 10.000 rpm e os tubos foram vertidos, descartando o meio BHI e preservando-se apenas as células. As células foram lavadas em 500uL de tampão TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM pH 8.0) e centrifugadas por 5 min. Esse procedimento foi realizado 3 vezes. As amostras foram levadas em banho-Maria a 100°C por 10 minutos para o rompimento da membrana plasmática e liberação do DNA e centrifugadas por 10 minutos. O sobrenadante que contém o DNA foi removido e vertido em tubos de microcentrífuga novos e esterilizados.

4.2.4 Identificação por meio da PCR de *S.mutans*

As amostras isoladas de *S. mutans* foram identificadas pela PCR com *primers* que flanqueiam o gene da glicosiltransferase (GTFB-F e GTFB-R -517 pb) descritos previamente (OHO et al., 2000).

Tabela 1: *Primers* para PCR específica para o gene da glicosiltransferase de *S.mutans*

Primer	Seqüência (5' a 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
GTFB-F	5'- ACT ACACTTTCGGGTGGCTTGG-3'	517pb
GTFB-R	GTFB-R 5'- CAG TAT AAGCGC CAG TTT CATC -3'	

A mistura da PCR consistiu de um volume final de 10 µl contendo 1,5mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 1 µM de cada *primer*, 1U de Taq DNA polimerase e 2 µl da solução de DNA. As condições da amplificação foram de desnaturação a 95°C por 30s, seguida de pareamento dos *primers* a 59°C por 30s e extensão a 72°C por 1 min. Esta amplificação foi repetida por 30 ciclos. Após a amplificação, 10 µl do produto da PCR foram analisados pela eletroforese em gel de agarose (1,0%). O gel foi corado por Syber-safe (Invitrogen) e os fragmentos recém-sintetizados foram visualizados sob luz ultravioleta. O tamanho do produto

amplificado pela PCR foi estimado a partir da migração eletroforética do produto relativo ao marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb (Invitrogen).

4.2.5 Genotipagem por AP-PCR

A AP-PCR foi realizada com o *primer* OPA-13 descritos por Li e Caufield (1998). A análise comparativa dos géis foi feita a partir do alinhamento dos mesmos, considerando cada marcador de tamanho de bandas de DNA como ponto de referência. As bandas de DNA identificadas para cada uma das amostras foram utilizadas para a construção de uma matriz binária, na qual o valor zero (0 - ausência da banda de DNA para a linhagem analisada) e um (1 - presença da banda de DNA). Esta matriz foi analisada usando o algoritmo do Coeficiente de Similaridade de Jaccard, o qual não considerou as similaridades negativas, isto é, a ausência do produto. A escala de valores deste coeficiente varia de zero (0 - para dissimilaridade total), a um (1 - para similaridade total entre as linhagens). A matriz de coeficientes de similaridade genética gerada foi utilizada para a obtenção de agrupamento pelo método UPGMA, para a construção de dendrogramas utilizando o programa de computador NTSYS-PC (ver 2.1) (ROHLF, 2002).

4.2.6 Análise Estatística

Para realizar o objetivo proposto realizou-se inicialmente uma estatística descritiva com os dados. Esta metodologia tem como objetivo básico sintetizar uma série de valores de mesma natureza, permitindo que se tenha uma visão global da variação desses valores.

Também foi calculado o Odds Ratio Bruto através do Modelo de Regressão Logística Simples, dado que a resposta era binária (criança com ou sem experiência de cárie).

4.3 RESULTADOS

Neste estudo, foram analisados 210 isolados coletados. Pela Tabela 1, observa-se que dentre as crianças livres de cárie, 58,22% tinham idade entre 4 e 5 anos, 75% do gênero masculino e 66,67% apresentaram um genótipo. Já dentre as crianças com presença de cárie 44,44% tinham entre 6 e 7 anos de idade, 66,67% do gênero masculino e 77,78%

apresentaram dois ou mais genótipos. Após esta estatística descritiva, foi calculado o Odds Ratio Bruto (OR) através do Modelo de Regressão Logística Simples, sendo os resultados também apresentados na Tabela 1.

Observa-se pela Tabela 1 associação positiva da variável cárie dentária em relação aos genótipos (OR =7, IC 95%:0,969-50,567).

Tabela 1 – Descrição das variáveis qualitativas em estudo por presença ou não presença de cárie e os respectivos resultados do modelo de regressão logística simples.

Variáveis	Cárie				OR Bruto	IC(95%)	Valor-p
	Não		Sim				
	N	%	N	%			
Idade (anos)							
1 a 3	3	25	3	33,33	1		
4 e 5	7	58,33	2	22,22	0,286	0,030	2,692 0,560
6 e 7	2	16,67	4	44,44	2	0,194	20,614 0,274
Gênero							
Feminino	3	25	3	33,33	1		
Masculino	9	75	6	66,67	1,50	0,223	10,077 0,677
Genótipos							
1	8	66,67	2	22,22	1		
2 ou mais	4	33,33	7	77,78	7	0,969	50,567 0,050

4.4 DISCUSSÃO

A cárie dentária é uma doença de etiologia complexa, considerada o principal problema de saúde bucal entre pré-escolares (SBrasil, 2010), e objeto de inúmeros trabalhos científicos que buscam à elucidação de seus fatores de risco, prevenção, controle e tratamento. A sua susceptibilidade depende de uma série de fatores comportamentais, além

de fatores intrínsecos do hospedeiro e do *S. mutans* (LIU et al., 2010; HOLBROOK e MANGNÚSDÓTTIR, 2012). Segundo (HAMADA e SLADE, 1980; LOESCHE, 1986), apesar do *S. mutans* ser considerado o principal agente etiológico da cárie, a simples presença desta bactéria na cavidade bucal nem sempre leva ao desenvolvimento da doença, já que o *S. mutans* pode ser encontrado não somente em populações com moderada ou alta prevalência (BEIGHHTON et al., 1987; ALALUUSUA et al., 1987), mas também em populações que não têm ou têm baixa experiência com cárie (MATEE et al., 1993; HOLBROOK e MANGNÚSDÓTTIR, 2012). No presente estudo, também ficou constatado a presença de *S. mutans* na totalidade da amostra estudada, embora o número de unidades formadoras de colônia tenha sido identificado como baixa contagem de *S. mutans* em 66,67% e moderada contagem em 33,33%, nas crianças estudadas.

Saarela et al. (1996), sugeriu que alguns isolados de *S. mutans* são mais cariogênicos do que outros, uma vez que a simples presença de grandes quantidades desta bactéria na saliva não pode ser correlacionada com a presença de lesões cariosas. Alalusua et al. (1996), verificaram que crianças com elevado consumo de sacarose -apresentaram maior incidência de cárie quando comparadas às crianças com consumo menor, constatando-se ainda uma maior variabilidade genotípica nas bactérias isoladas das crianças com cárie, indicando que o consumo elevado de sacarose poderia estar relacionado à maior diversidade de *S. mutans* na cavidade bucal. Resultados também constatados por Arthur et al. (2011), sugerindo que biofilmes formados em condições de alta cariogenicidade podem abrigar genótipos de *S. mutans* mais acidogênico e acidúrico. Estes apontamentos suportaram os critérios para inclusão das crianças no presente estudo, selecionando-se para a composição da amostra crianças com consumo de carboidratos superior a seis vezes ao dia.

Os dados deste estudo permitiu observar que não houve correlação da diversidade genotípica dos *S. mutans* com a idade e o gênero das crianças, confirmando os estudos de Kulkarni et al. (1989), que também observou que não existe concordância de que o número de genótipos encontrados esteja relacionado com a idade da criança. O estudo de Mattos-Graner et al. (2001), também não observou associação significativa entre diversidade genotípica de estreptococos grupo mutans em relação ao número de dentes erupcionados e a idade. Embora a presença de dentes irrompidos na cavidade bucal de crianças parece ter grande importância para que haja colonização por estreptococos grupo mutans (CAUFIELD et al., 1993).

Neste estudo, foram analisados 210 isolados coletados de 21 crianças, 12 crianças livres de cárie e 9 com experiência de cárie. Na análise ficou constatado um baixo número de genótipos presentes na saliva das crianças estudadas. Para o grupo sem experiência de cárie foram detectadas 8 crianças que apresentaram apenas 1 genótipo de *S. mutans* e 4 crianças que apresentaram 2 ou mais genótipos. Em contraste, no grupo com experiência de cárie, apenas 2 crianças se apresentaram com 1 genótipo, enquanto que 7 crianças apresentaram 2 ou mais genótipos. Desta forma, 66,67% das crianças livres de cárie apresentaram apenas um genótipo, enquanto 77,78% das crianças com experiência de cárie apresentaram dois ou mais genótipos. Esses resultados vão de encontro com estudos realizados por (PIERALISI et al., 2010; CHEON et al., 2013; ZHOU et al., 2011) onde crianças podem abrir de 1-5 diferentes genótipos de *S. mutans*. Cheon et al. (2011), analisando a diversidade genotípica dos *S. mutans* constatou uma média de 1.6 genótipos em crianças (N= 10) e 2.4 em adultos (N=12). Por outro lado, Napimoga et al. (2005), encontraram o máximo de 8 genótipos em indivíduos cárie-ativa. Emanuelson et al. (2003), em um estudo feito com jovens adultos também encontrou o máximo de 7 genótipos em indivíduos com experiência de cárie. Por outro lado, Jiang et al. (2012), detectaram 28 genótipos de *S. mutans* em 7 indivíduos livres de cárie, onde cada indivíduo apresentava uma média de 3-7 genótipos. Esses mesmos autores, encontraram 16 genótipos de *S. mutans* em 7 indivíduos com cárie ativa e cada um desses indivíduos apresentava em média de 1-3 genótipos. No entanto os autores afirmaram que para que uma conclusão mais definitiva destes resultados seria necessário estudos mais aprofundados do polimorfismo genético para melhor elucidar o papel da genética nas bactérias envolvidas na cárie dentária. Opondo-se aos relatos acima, Lembo et al. (2007), afirmou não haver diferenças significativas no número de genótipos detectado em crianças livres de cárie e com cárie ativa, na técnica de genotipagem ou as diferenças nas populações estudadas.

Os achados da presente pesquisa apontou uma associação positiva entre a atividade de cárie e a diversidade genotípica de *S. mutans* ($P=0,05$). Este resultado vai de encontro aos achados de estudos previamente realizados sobre a diversidade genotípica na presença de cárie. Este resultado confirma os achados de (ZHOU et al., 2005; NAPIMOGA et al., 2005; PIERALISI et al., 2010; GAMBOA et al., 2010.; ZHOU et al., 2011; ARTHUR et al., 2011; JIANG et al., 2012; CHEON et al., 2013), embora tenha ocorrido diferenças na composição da amostra. As amostras de estudos prévios, tem sido coletadas de maneira aleatória, com grupo de crianças selecionadas ao acaso, ou seja, separando-as as crianças em crianças

livre de cárie e com cárie ativa somente. Contrastando com pesquisas anteriores, a presente pesquisa trabalhou com um grupo de crianças, participantes de um mesmo programa de prevenção, focado na implementação de medidas educativas aos pais e preventivas às crianças, desde o primeiro ano de vida, reavaliadas bimestralmente. Embora o atendimento fosse oferecido à todas as crianças e familiares de maneira integral, para um grupo de crianças observou-se o aparecimento de lesões. Deste questionamento veio a seleção da amostra, ou seja, crianças que apresentavam 3 fatores de risco à cárie e acompanhamento por mais de 3 anos no programa, associando-se a diversidade genotípica em crianças com e sem experiência de cárie dentária. Dentre os resultados encontrados, observou-se que ter 2 ou mais genótipos é fator de risco para cárie (OR= 7, IC 95%:0,969-50,567). Ou seja, crianças com dois ou mais genótipos tem 7 vezes a chance de ter cárie em relação a quem tem 1 genótipo. Embora os resultados de Kreulen et al. (1997) demonstraram uma relação negativa entre atividade de cárie e diversidade genotípica.

Embora os resultados acima descrito tenham apontado diferenças na diversidade genotípica de *S. mutans* nas crianças estudadas, investigação futuras necessitam ser realizadas, por meio de estudos longitudinais mais aprofundados do polimorfismo genético, buscando melhor elucidar o papel da genética nas bactérias envolvidas na cárie dentária.

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados deste estudo mostraram que:

- A presença de dois ou mais genótipos é um fator de risco à cárie.
- Crianças com cárie apresentaram maior número de genótipos confirmando a correlação da diversidade genotípica com a cárie dentária.
- Considerando a importância da identificação precoce de populações de risco à cárie, espera-se que mais estudos sejam realizados com a finalidade de conhecer melhor alguns aspectos genético-moleculares dos *S. mutans* que influenciam a saúde bucal dessas crianças e, assim, contribuir para melhoria da condição de saúde bucal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALALUUSUA, S.; KLEEMOLA-KIYALA, E.; NYSTRÖM, M.; EVÄLAHTI, M.; GRÖNROOS, L. Caries in the primary teeth and salivary *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* levels as indicators of caries in permanent teeth. *Pediatr Dent*, v. 9, p. 126-130, 1987.

ALALUUSUA, S; TAKEI, T; OOSHIMA, T, HAMADA ,S. Mutacinactivity of strains isolated from children with varying levels of mutans streptococci and caries. *Arch Oral Biol*,v 36,p.251–255, 1991.

ALALUUSUA, S.; MATTÖ, J.; GRÖNROOS,L. Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. *Archives of Oral Biology*, v.41, n. 2, pp. 167–173, 1996.

ARTHUR, R. A. et al. Genotypic and phenotypic analysis of S. mutans isolated from dental biofilms formed in vivo under high cariogenic conditions. *Braz. Dent. J.*, v. 22, p. 267-274, 2011.

BANAS, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front. Biosci.*, v. 9, p. 1267-1277, 2004.

BEIGHHTON, D.; RIPPON, H. R.; THOMAS, H. E. C. The distribution of *Streptococcus mutans* serotypes and dental caries in a group of 5 to 8 year-old. Hampshire schoolchildren. *J Br Dent*, v. 162, p. 103-106, 1987.

CAUFIELD, P. W.; CUTTER, G. R.; DASANAYAKE, A. P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res*, Chicago, v.72, n.1, p.37-45, Jan. 1993.

CHEON, K. et al. Genetic diversity of plaque mutans streptococci with rep-PCR. *J. Dent. Res.*, v. 90, p. 331-335, 2011.

CHEON, K. et al. Characteristics of *Streptococcus mutans* genotypes and dental caries in children. *Eur. J. Oral Sci.*, v. 121, p. 148-155, 2013.

EMANUELSSON, I. M.; CARLSSON, P.; HAMBERG, K.; BRATTHALL, D. "Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis," *Oral Microbiology and Immunology*, vol. 18, no. 1, pp. 24–29, 2003.

GAMBOA, F.; CHAVES, M.; VALDIVIESO, C. Genotypic profiles by AP-PCR of streptococcus mutans in caries-active and caries-free preschoolers. *Acta Odontol. Latinoam.*, v. 23, p. 143-149, 2010.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A. Selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.*, v. 18, p. 1357-1364, 1973.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, v. 44, p. 331-384, 1980.

HOLBROOK, P. W.; MAGNÚSDÓTTIR, O.M. Studies on strains of *Streptococcus mutans* isolated from caries-active and caries-free individuals in Iceland. *J Oral Microbiol.* 2012, v.4, n.1, 2012.

JIANG, Q. et al. AP-PCR detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in caries-free and caries-active subjects. *Mol. Cell. Biochem.*, v. 365-, p. 159-1645, 2012.

KÖHLER, B.; BRATTHALL, D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* in saliva. *J. Clin. Microbiol.*, v. 9, n. 5, p. 584-588, 1979.

KULKARNI, G. V.; CHAN, K. H.; SANDHAM, .J. An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of mutans streptococci. *J Dent Res*, Chicago, v.68, n.7, p.1155-1161, July 1989.

KREULEN,C. M; SOET, H. J.; HOGVEEN, R.; VEERKAMP, J. S. "Streptococcus mutans in children using nursing bottles," *Journal of Dentistry for Children*, v. 64, n. 3, p. 107–111,1997.

LEMBO, F. L.; LONGO, P. L.; TSUZUKI, C. OTA., RODRIGUES, C. R. M. D.; MAYER, M. P. A. "Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children," *Oral Microbiology*.,v. 22, n. 5, p. 313–319, 2007.

LI, Y.; CAUFIELD, P.W.The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. *J. Dent. Res.*, v. 74, p. 681-685, 1995.

LI, Y.; CAUFIELD, P. W. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 13, p. 17-22, 1998.

LIU, X. R.; LI, J. Analyzing the production of organic acid of different genotype streptococcus mutans isolated from children with different caries experience. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, v. 28, p. 404-407, 2010.

LOESCHE, W. J. Role of Streptococcus mutans in human dental decay: *Microbiol. Rev.*, v. 50, p. 353-380, 1986.

MATEE, M. I. et al. "Mutans streptococci in caries-active and caries-free infants in Tanzania," *Oral Microbiology and Immunology*, vol. 8, no. 5, pp. 322–324, 1993.

MATTOS-GRANER, R.O. *et al.* Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. *J Clin Microbiol*, Washington, v.39, n.6, p.2313-2316, June 2001b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *SBBrazil 2010*. Disponível em: <http://189.28.128.100/dab/docs/geral/projeto_sb2010_relatorio_final.pdf>. Acesso em : 27 jun. 2012.

MOSER, S. A. et al. Repetitive extragenic palindromic PCR for study of *Streptococcus mutans* diversity and transmission in human populations. *J. Clin. Microbiol.*, v. 48, p. 599-602, 2010.

NAPIMOGA, M. H. et al. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. *J. Oral Sci.*, v. 47, p. 47-59, 2005.

OHO, T, et al. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 15, n. 4, p. 258-262, 2000.

PALMER, E. A. et al. *Mutans streptococci* genetic strains in children with severe early childhood caries: follow-up study at one-year post-dental rehabilitation therapy. *J. Oral Microbiol.*, v. 4, 2012.

PIERALISI, F. J. et al. Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active preschool children. *Int. J. Dent.*, v. 824976, 2010.

PETERSEN, P. E. et al. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the World Health Organization*. v.83, n.9, sept. 2005. Disponível em: <http://www.who.int/bulletin/volumes/83/9/661.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2014.

SAARELA, M. et al (1996). Typing of *Streptococcus mutans* by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Arch Oral Biol* **41**, 821–826.

SVENSÄTER, G. et al. Acid tolerance response and survival by oral bacteria. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 12, p. 266-273, 1997.

TABCHOURY, C. P. et al. Evaluation of genotypic diversity of *Streptococcus mutans* using distinct arbitrary primers. *J. Appl. Oral Sci.*, v. 16, p. 403-407, 2008.

TANZER, J. M.; LIVINGSTON, J.; THOMPSON, A. M. The microbiology of primary dental caries in humans. *J. Dent. Educ.*, v. 65, p. 1028-1037, 2001.

TORRES, A. S. et al. Estreptococos do grupo *mutans*: avaliação do ágar SB 20 e MSB na determinação de UFC na saliva e na placa dental de adolescentes. *Rev. Bras. Odontol.*, v. 50, p. 18-21, 1993.

ZHOU, J. et al. Study on the horizontal transmission of oral *Streptococcus mutans* in children. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, v. 23, p. 388-390, 2005.

ZHOU, Q. et al. Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in 3-4-year-old children with severe caries or without caries. *Int. J. Paediatr. Dent.*, v. 21, p. 422-431, 2011.

ANEXOS

ANEXO 1

Nome _____

_Nº prontuário _____ Idade: ___ a ___ m

Avaliação do índice de higiene bucal (Green; Vermilhon)

Data do Exame: ___/___/___ IHO: _____

Comportamento da criança durante o atendimento

- () 1. Definitivamente positivo
- () 2. Positivo
- () 3. Negativo
- () 4. Definitivamente negativo

Coleta da saliva

Data do Exame: ___/___/___

ANEXO 2

Fatores de Risco
AMAMENTAÇÃO NOTURNA OU MAMAR DE MADRUGADA
CONTEÚDO DA MAMADEIRA (AÇÚCAR OU FARINÁCEOS)
HIGIENE NOTURNA AUSENTE
PRESENÇA DE PLACA VISÍVEL
HIGIENE DURANTE O DIA (< 3X AO DIA)
CONSUMO DE CARBOIDRATOS(> 5 VEZES AO DIA), OU ENTRE AS REFEIÇÕES
HISTÓRIA DE CÁRIE (LESÃO DE MANCHA BRANCA ATIVA OU + DE 2 LESÕES DE CÁRIE NO ÚLTIMO ANO)
FOSSAS E FISSURAS PROFUNDAS NOS MOLARES
AUSÊNCIA DO USO DE FLÚOR
HISTÓRIA FAMILIAR DE LESÕES DE CÁRIE OU CÁRIE ATIVA
DEFEITOS CONGÊNITOS