



Universidade Norte do Paraná

UNOPAR

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

ANA LÍDIA SOARES COTA

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENOTÍPICA DE
STREPTOCOCCUS MUTANS ISOLADOS DE PRÉ-
ESCOLARES COM E SEM ASSISTÊNCIA ODONTOLÓGICA
PRECOCE**

Londrina
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANA LÍDIA SOARES COTA

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENOTÍPICA DE
STREPTOCOCCUS MUTANS ISOLADOS DE PRÉ-
ESCOLARES COM E SEM ASSISTÊNCIA ODONTOLÓGICA
PRECOCE**

Dissertação apresentada à Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, como parte integrante dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

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

Co-Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Cássia Cilene Dezan Garbelini

Londrina
2008

ANA LÍDIA SOARES COTA

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENOTÍPICA DE
STREPTOCOCCUS MUTANS ISOLADOS DE PRÉ-
ESCOLARES COM E SEM ASSISTÊNCIA ODONTOLÓGICA
PRECOCE**

Dissertação apresentada à Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, como parte integrante dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Célio Percinoto

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. Luiz Reynaldo de Figueiredo Walter

Julgamento _____ Assinatura _____

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

Julgamento _____ Assinatura _____

Londrina, 21 de novembro de 2008.

Este trabalho é inteiramente dedicado à **minha família**:

Aos **meus pais, Maria José Soares Cota e Roosevelt Patriota Cota**, fontes de inspiração, reflexo do verdadeiro amor. Obrigada por participarem deste meu sonho e transformarem, sempre com muita sapiência, o meu viver. Sou apaixonada por vocês;

Aos **meus irmãos, Rogério, Rafael e Ricardo Soares Cota**, pelas demonstrações de felicidade ao compartilharem minhas conquistas e por perceberem a necessidade de, mesmo à distância, sermos um;

Ao meu amado **sobrinho, Vinicius Cavalcanti Cota**, pequeno grande ser que, por estar distante, foi capaz de se tornar o maior motivo de minhas angústias. Quanta saudade!

Aos meus tios, tias, primos, primas e cunhadas por me incentivarem e fazerem parte da minha vida.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus** por diariamente revelar Sua bondade infinita e justiça absoluta; Contigo ao meu lado tornei-me forte e persistente na fé;

À **Profª. Drª. Regina Célia Poli-Frederico** pela valiosa orientação, sempre com palavras de estímulo e atitudes determinadas, uma brilhante mestra, sinônimo de paciência e dedicação;

À **Profª. Drª. Cássia Cilene Dezan Garbelini** pela intensa e essencial co-orientação, digna de admiração e exemplo de vida;

Às **professoras colaboradoras** neste projeto, **Profª. Drª. Flaviana Bombarda de Andrade Ferreira e Profª. Drª. Leila Maria Cesário Pinto**, que com muita experiência foram verdadeiras agregadoras de conhecimento;

Aos **pais e seus respectivos filhos** integrantes da pesquisa, pela confiança e fundamental participação;

Às **alunas de Iniciação Científica** de Odontologia da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR) **Gabriela Ferracin, Miula Portelinha Braga e Sibelli Parreira Olivieri**, pela importante ajuda nos procedimentos laboratoriais;

Ao **professor Jefferson Rosa Cardoso** da Universidade Estadual de Londrina (UEL) pela assessoria na análise estatística;

Ao **professor José Eduardo Garcia** da UEL pela colaboração durante a elaboração dos dendrogramas;

A todos os **professores do curso de Mestrado** pelo constante apoio e transmissão do saber;

Aos meus queridos e estimados **professores da graduação da Universidade Federal de Alagoas, Profª. Drª. Maria Dânia Holanda Tenório e Prof. Dr. Milton Fernando de Andrade Silva**, pelo incessante incentivo;

Aos meus **colegas de turma, Clarissa Vendramel Fernandes, Elaine Romero, Fabiana Mezzaroba Ortenzi Graciano, José Mário da Silva Filho, Larissa Pinceli Chaves, Leônidas dos Santos Filho e Lícia Beatriz de Melo Zapatta**, pela convivência e amizade. Em especial à amiga **Katia Bosso**, ombro amigo, sempre disposta, sensível e muito, muito companheira;

À amiga **Roberta Barros Antunes** pela forte parceria, pela alegria de viver e por fazer presença nos momentos mais difíceis, vou sentir saudade;

À amiga **Sabrina Valéria de Souza** pelo acolhimento sincero e companhia fraternal;

Aos **amigos da saudosa Maceió** que mesmo distantes emanaram bons fluidos e aumentaram minha força para continuar a caminhada;

À **Secretaria Municipal de Saúde de Maceió - AL**, particularmente à **Dr^a. Genoveva Marques de Aguiar**, pelo empenho em providenciar meu afastamento.

Serei eternamente grata a TODOS vocês!

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

À **Universidade Norte do Paraná** representada pelo Chanceler, **Sr. Marco Antônio Laffranchi** e pela Reitora, **Profª. Elisabeth Bueno Laffranchi**;

À **Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**, representada pelo **Prof. Dr. Hélio Hiroshi Suguimoto**;

Ao **Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**, representado pelo **Prof. Ruy Moreira da Costa Filho**;

À **Coordenação do Curso de Mestrado em Odontologia**, representada pelo **Prof. Dr. Luiz Reynaldo de Figueiredo Walter**;

A todos os **funcionários** da UNOPAR;

À **FUNADESP** pelo imprescindível apoio financeiro;

À **Diretoria**, representada pelo **Prof. Dr. Antonio Ferelle**, aos **professores, residentes, alunos, voluntários e funcionários do Núcleo de Odontologia para Bebês da Universidade Estadual de Londrina, Bebê Clínica - UEL**;

À **Diretoria**, representada pela **Profª. Cristiane Martins Kussima**, aos **professores e funcionários do Centro Municipal de Educação Infantil Valéria Veronesi**.

A vida é escuridão, a não ser que haja
necessidade;
E toda necessidade é cega, a não ser que haja
conhecimento;
E todo conhecimento é vazio, a não ser que haja
trabalho;
E todo o trabalho é vazio, a não ser que haja
amor.

Khalil Gibran

COTA, Ana Lúcia Soares. **Avaliação da diversidade genotípica de *Streptococcus mutans* isolados de pré-escolares com e sem assistência odontológica precoce**. 2008. 79f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2008.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a diversidade genotípica de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) isolados de pré-escolares com e sem assistência odontológica precoce e associá-la a condições e fatores relacionados à cárie dentária. Participaram da pesquisa 40 crianças de cinco anos de idade, sendo 20 com assistência odontológica desde o primeiro ano de vida (G1) e 20 sem assistência odontológica precoce (G2). As condições bucais das crianças foram avaliadas utilizando-se o índice ceo-d para determinação da experiência e severidade da cárie dentária e através do Índice de Higiene Oral Simplificado (IHOS). Foram coletadas amostras de saliva para avaliação do nível salivar de EGM e posterior identificação molecular da espécie *S. mutans* pela amplificação do gene *gtfB* e genotipagem, através da Amplificação ao Acaso de DNA Polimórfico (RAPD), utilizando-se os *primers* OPA-02 e OPA-13. Os pré-escolares do G1 e G2 abrigaram em média, respectivamente, 4,40 e 4,45 genótipos distintos de *S. mutans* em sua cavidade bucal. Foram observadas uma associação estatisticamente significativa ($P=0,021$) e uma moderada correlação ($r=0,503$) entre a diversidade genotípica dos *S. mutans* e a experiência de cárie somente no G1. Os resultados sugerem que as ações realizadas no programa educativo-preventivo podem estar contribuindo para o estabelecimento de uma microbiota distinta, visto que o G1 apresentou 22 genótipos de *S. mutans* específicos para esta população.

Palavras-chave: Genótipo. *Streptococcus mutans*. Amplificação ao Acaso de DNA Polimórfico (RAPD). Cárie dentária. Pré-escolares.

COTA, Ana Lúcia Soares. **Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* in preschool with and without precocious odontologic assistance.** 2008. 79f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2008.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the genotypic diversity of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) in preschool with and without precocious odontologic assistance and associating it with conditions and factors related to the dental caries. Forty children aged five years old were included in this study. Twenty children with precocious odontologic assistance (G1) and twenty children were from the nursery class without precocious odontologic assistance (G2). Their oral health status was assessed through the prevalence and severity of caries, according the World Health Organization (WHO) guidelines and through the plaque index (IHOS). *S. mutans* isolation and salivary levels were carried out by using saliva samples. In order to confirm their molecular profile *S. mutans* was submitted to the PCR method, using specific *primers* for portions of the glucosyltransferase gene (*gtfB*). The RAPD method was used to detect the genetic polymorphism of *S. mutans* strains using the *primers* OPA-02 and OPA-13. Preschool of G1 and G2 had sheltered on average, respectively, 4,40 and 4,45 distinct genotypes of *S. mutans*. A statistical significant association ($P=0,021$) and a moderate correlation had been observed ($r=0,503$) between the genotypic diversity of the *S. mutans* and the experience of caries in G1. Our results suggest that the actions carried through in the preventive-education program can be contributing for the distinct microbiota since that in G1 showed 22 genotypes exclusive for this population.

Key words: Genotype. *Streptococcus mutans*. Random Amplified Polymorphic DNA Technique (RAPD). Dental caries. Preschool.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fotografia 1 - Fucsina básica a 2% utilizada na evidênciação da placa bacteriana.....	32
Fotografia 2 - Superfícies dentárias coradas e selecionadas para a avaliação do IHOS.....	32
Fotografia 3 - Materiais utilizados na coleta da saliva: (A) Parafilm [®] “M”, (B) espátula de madeira esterilizada e (C) placa tipo Rodac [®] contendo meio ágar mitis-salivarius acrescido de sacarose (15%), bacitracina (0,2 U/mL) e telurito de potássio (1%).....	34
Fotografia 4 - Contador de Colônias Mecânico.....	35
Fotografia 5 - Crescimento microbiano após incubação por 48 horas: baixo risco (A), médio risco (B) e alto risco de cárie dentária (C).....	35
Fotografia 6 - Transferência de uma colônia típica de <i>S. mutans</i> para o caldo BHI.....	36
Fotografia 7 - Extração do DNA cromossômico bacteriano: (A) crescimento de colônia isolada em caldo BHI, (B) centrifugação a 10.000 rpm por dez minutos, (C) ebulição a 100°C por dez minutos e (D) coleta do sobrenadante.....	37
Quadro 1 - <i>Primers</i> utilizados na PCR específica para o gene <i>gtfB</i>	38
Quadro 2 - <i>Primers</i> utilizados nas RAPDs.....	39
Fotografia 8 - Reagentes das RAPDs: (A) Tampão, (B) MG2I ₂ , (C) <i>Primer</i> , (D) Taq DNA polymerase, (E) dNTPs, (F) água ultrapura e (G) amostra de DNA bacteriano.....	40

Fotografia 9 - Termociclador utilizado nas reações	40
Fotografia 10 - Eletroforese em gel de agarose (2%) e tampão Tris-Borato - EDTA (0,5X - pH 8,0).....	41
Figura 11 - Visualização sob luz ultravioleta dos produtos amplificados pela RAPD.....	41
Gráfico 1 - Mediana e quartis do índice ceo-d entre os pré-escolares do G1 e G2	45
Gráfico 2 - Composição do índice ceo-d no G1 e G2.....	45
Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose da amplificação pela PCR do gene <i>gtfB</i> de <i>S. mutans</i> isolados da cavidade bucal de pré-escolar com cárie dentária. A seta indica a presença do fragmento de 517 pb referente ao gene da glicosiltransferase B. M=marcador de peso molecular (250 pb Ladder), C+=controle positivo da PCR e NO=controle negativo da PCR.....	49
Figura 2 - Dendrograma baseado nos perfis de RAPD ilustrando a diversidade genotípica de <i>S. mutans</i> isolados de pré-escolares do G1. Em destaque a presença de oito genótipos distintos de <i>S. mutans</i> isolados da criança B15 com cárie dentária.....	50
Figura 3 - Dendrograma baseado nos perfis de RAPD ilustrando a diversidade genotípica de <i>S. mutans</i> isolados de pré-escolares do G2. Em destaque a presença de sete genótipos distintos de <i>S. mutans</i> isolados da criança C6 sem cárie dentária.....	51
Figura 4 - Dendrograma baseado nos perfis de RAPD ilustrando a diversidade genotípica de <i>S. mutans</i> entre os pré-escolares dos G1 e G2. As setas cheias indicam a presença dos segmentos contendo os 22 genótipos de <i>S. mutans</i> exclusivos do G1 e as setas pontilhadas indicam os 51 genótipos de <i>S. mutans</i>	

exclusivos do G2..... 52

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por RAPD utilizando os *primers* OPA-02 (A) e OPA-13 (B). M=marcador de peso molecular (DNA Ladder 100 pb), C+=controle positivo da RAPD e NO=controle negativo da RAPD..... 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil da população do estudo (n=40)	29
Tabela 2 - Frequências absoluta (n) e relativa (%) das categorias relacionadas à atividade de cárie dentária, IHOS e nível salivar de EGM entre pré-escolares com e sem assistência odontológica precoce (n=40).....	46
Tabela 3 - Frequências absoluta (n) e relativa (%) sobre a utilização de mamadeira noturna, número de escovação dentária e uso de fio dental entre pré-escolares com e sem assistência odontológica precoce (n=40).....	47
Tabela 4 - Distribuição do número de isolados positivos de <i>S. mutans</i> entre pré-escolares com e sem cárie dentária dos G1 e G2 (n=40).....	48
Tabela 5 - Diversidade genotípica dos <i>S. mutans</i> , experiência, severidade e atividade de cárie dentária no G1 e G2 (n=40).....	55
Tabela 6 - Diversidade genotípica dos <i>S. mutans</i> , IHOS e nível salivar de EGM no G1 e G2 (n=40).....	56
Tabela 7 - Diversidade genotípica dos <i>S. mutans</i> , utilização de mamadeira noturna, número de escovação dentária e uso de fio dental no G1 e G2 (n=40).....	57

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AP-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase utilizando <i>primers</i> Arbitrários
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusão de cérebro e coração
°C	Graus Celsius
C ⁺	Controle positivo
C ⁻	Controle negativo
ceo-d	Número de dentes decíduos cariados, extraídos ou com extração indicada e obturados
CO ₂	Gás carbônico
DP	Desvio padrão
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGM	Estreptococos do grupo <i>mutans</i>
IHOS	Índice de Higiene Oral Simplificado
GTF	Enzima glicosiltransferase
G1	Com assistência odontológica precoce
G2	Sem assistência odontológica precoce
H ₀	Hipótese nula
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
MG2l ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
MLEE	Eletroforese de enzimas codificadas por multilocus

mm	Milímetro
mM	Milimolar
n	Freqüência absoluta
NO	Controle negativo/ Amostra sem DNA
NOB	Núcleo de Odontologia para Bebês
NTSYS-PC	Software: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Tamanho do fragmento do gene em pares de base
<i>P</i>	Significância do teste estatístico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PR	Paraná (estado brasileiro)
<i>r</i>	Coefficiente de correlação
RAPD	Amplificação ao Acaso de DNA Polimórfico
RFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
rpm	Rotações por minuto
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. sobrinus</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
TE	Tampão tris HCl e EDTA
U	Unidade
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
UNOPAR	Universidade Norte do Paraná
\bar{X}	Média aritmética
χ^2	Teste estatístico do qui-quadrado
μg	Micrograma
μL	Microlitro

μM

Micromolar

%

Frequência relativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 <i>S. mutans</i>	21
2.2 DIVERSIDADE GENOTÍPICA DE <i>S. mutans</i> E CÁRIE DENTÁRIA.....	22
3 PROPOSIÇÃO	26
4 MATERIAL E MÉTODO.....	27
4.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS	27
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	28
4.4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	29
4.5 COLETA DOS DADOS.....	30
4.5.1 Entrevista	30
4.5.2 Avaliação da Experiência, Atividade e Severidade da Cárie Dentária	30
4.5.3 Avaliação do Índice de Higiene Oral Simplificado	31
4.5.4 Nível Salivar de EGM	33
4.5.5 Avaliação da Diversidade Genotípica dos <i>S. mutans</i>	36
4.5.5.1 Extração do DNA cromossômico bacteriano	36
4.5.5.2 Identificação molecular dos <i>S. mutans</i>	37
4.5.5.3 Determinação da diversidade genotípica dos <i>S. mutans</i>	39
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5 RESULTADOS	44
5.1 VARIÁVEIS CLÍNICAS E COMPORTAMENTAIS E IDENTIFICAÇÃO DOS <i>S. mutans</i>	44
5.2 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENOTÍPICA DOS <i>S. mutans</i>	49
6 DISCUSSÃO	58

6.1 VARIÁVEIS CLÍNICAS E COMPORTAMENTAIS	58
6.2 IDENTIFICAÇÃO DOS <i>S. mutans</i>	61
6.3 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENOTÍPICA DOS <i>S. mutans</i>	62
7 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	68
APÊNDICES	73
APÊNDICE A - Carta de Esclarecimento aos Pais e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	74
APÊNDICE B - Questionário.....	75
ANEXO	78
ANEXO - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNOPAR.....	79

1 INTRODUÇÃO

Os estreptococos do grupo *mutans* (EGM) são considerados os principais agentes etiológicos da cárie dentária (HAMADA; SLADE, 1980) sendo que as espécies comumente isoladas em humanos são os *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (sorotipos *c*, *e* e *f*) e os *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) (sorotipos *d* e *g*) (LÖESCHE, 1986). Devido aos seus fatores de virulência, os *S. mutans* são os microrganismos colonizadores da cavidade bucal humana de maior cariogenicidade (HAMADA; SLADE, 1980; LÖESCHE, 1986).

Dentre outros mecanismos, a virulência dessa espécie está relacionada a sua habilidade de converter a sacarose através da atividade de três enzimas denominadas glicosiltransferases (GTFB, GTFC e GTFD) em polissacarídeos extracelulares insolúveis, os glucanos, extremamente importantes na aderência bacteriana às superfícies lisas dos dentes (MATTOS-GRANER et al., 2004; MOTEGI et al., 2006; SHEMESH et al., 2006; YAMASHITA et al., 1993) contribuindo, assim, para a deterioração da estrutura dentária (GOODMAN; GAO, 2000).

S. mutans exibem intensa diversidade genotípica, mas o papel desta variação ainda é pouco compreendido (LEMBO et al., 2007) uma vez que diferentes clones poderiam indicar mecanismos diferentes de virulência (GUO et al., 2008).

Variações significativas no potencial de indução da cárie dentária foram observadas quando comparados genótipos diferentes de *S. mutans* em modelos animais (KÖHLER; KRASSE, 1990). Acredita-se que a capacidade de genótipos específicos competirem com outras linhagens seria essencial para sua colonização (LONGO; MATTOS-GRANER; MAYER, 2003) e, conseqüentemente, alguns genótipos poderiam colonizar o hospedeiro e induzir a cárie dentária melhor do que outros (ALALUUSUA et al., 1996; KÖHLER; KRASSE, 1990; LEMBO et al., 2007).

A literatura evidencia a necessidade da compreensão sobre os padrões de clonalidade dos *S. mutans* em indivíduos com e sem cárie dentária (BOWDEN, 1997). Entretanto, não existe consenso acerca da relação entre experiência de doença e heterogeneidade genética de *S. mutans*. Desta forma, estudos sobre a

correlação dos fatores de virulência desses microrganismos e a diversidade das espécies são fundamentais para entender a colonização de diferentes genótipos no mesmo indivíduo e a expressão de características que podem ou não influenciar sua virulência e capacidade de sobreviver em diferentes condições ambientais (NAPIMOGA et al., 2005).

Nesse contexto, a investigação de características genotípicas dos *S. mutans* e a utilização de técnicas de biologia molecular têm permitido um significativo desenvolvimento da compreensão do processo da cárie dentária (NÖR, 2005; LIU et al., 2007). Diversas pesquisas, utilizando diferentes métodos moleculares, demonstraram que os indivíduos podem ser colonizados por mais de um genótipo de *S. mutans* (CAUFIELD; WALKER, 1989; LIU et al., 2007; NAPIMOGA et al., 2004; REDMO EMANUELSSON; LI; BRATTHALL, 1998; REDMO EMANUELSSON; WANG, 1998; ROSA et al., 2006). A RAPD ou AP-PCR (Amplificação ao Acaso de DNA Polimórfico ou Reação em Cadeia da Polimerase utilizando *primers* Arbitrários) destaca-se como um método bastante sensível para avaliar a diversidade genotípica entre isolados de *S. mutans* (GRÖNROOS; ALALUUSUA, 2000; HAMES-KOCABAS et al., 2008; KLEIN et al., 2004; LI; CAUFIELD, 1998; REDMO EMANUELSSON et al., 2003; SAARELA et al., 1996; SPOLIDORIO et al., 2003).

A partir do questionamento “por que algumas crianças ainda apresentam experiência de cárie dentária, mesmo com assistência odontológica desde o primeiro ano de vida?”, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar a diversidade genotípica de *S. mutans* isolados de pré-escolares com e sem assistência odontológica precoce e associá-la a condições e fatores relacionados à cárie dentária.

Considerando a importância da identificação precoce de populações de risco à cárie dentária, espera-se conhecer melhor alguns aspectos genético-moleculares dos *S. mutans* que influenciam a saúde bucal dessas crianças e, assim, contribuir para a sua melhoria.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *S. mutans*

Os EGM, notadamente *S. mutans* e *S. sobrinus*, desempenham um importante papel na etiologia da cárie dentária (HAMADA; SLADE, 1980). Identificá-los precocemente é uma medida importante para prevenir a cárie dentária na infância (OHO et al., 2000) visto que a colonização simultânea por essas duas espécies tem sido reconhecida como um indicador de risco diretamente relacionado com o desenvolvimento da doença na dentição decídua (OKADA et al., 2002; SEKI et al., 2006; THENISCH et al., 2006).

S. mutans são cocos gram-positivos e normalmente ovalados, dispostos isoladamente, em diplococos, cadeias ou formando pequenas massas. São anaeróbios facultativos, possuem um metabolismo predominantemente fermentativo e podem colonizar todas as superfícies dentárias, inclusive as faces lisas de esmalte onde existe maior dificuldade de se produzir lesões de cárie dentária (DE LORENZO, 2004). Em meio de cultura ágar mitis-salivarius formam colônias pequenas, convexas, rugosas, fortemente aderidas ao substrato, com bordas irregulares e morfologia semelhante a uma amora. Com adição de sacarose ao ágar, algumas linhagens de *S. mutans* produzem colônias de cerca de um mm de diâmetro (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973; LEMBO et al., 2007).

O completo sequenciamento do genoma da cepa referencial UA 159 dos *S. mutans* foi inicialmente publicada por Ajdić et al. (2002). Esta análise revelou um genoma composto de 2.030.936 pares de nucleotídeos e possibilitou uma melhor compreensão da complexidade e especificidade genética destes microrganismos. Foram identificados diversos genes associados a seus fatores de virulência e fornecidas informações adicionais de como os *S. mutans* se adaptam ao ambiente bucal, sobrevivem aos mecanismos de defesa do hospedeiro e utilizam recursos contra microrganismos competidores.

2.2 DIVERSIDADE GENOTÍPICA DE *S. mutans* E CÁRIE DENTÁRIA

A tipagem de isolados bacterianos é realizada a fim de determinar se certas linhagens estão associadas a doenças específicas e para caracterizar a variabilidade das infecções (NASCIMENTO; HÖFLING; GONÇALVES, 2004).

Métodos de genotipagem têm revelado considerável heterogeneidade genética entre *S. mutans* isolados da saliva e da placa dentária (LI; CAUFIELD, 1998; SAARELA et al., 1993; SAARELA et al., 1996). Entretanto, ainda existe informação insuficiente sobre a relação entre a diversidade clonal e as características de virulência de *S. mutans* assim como seu comportamento quando comparadas cepas isoladas de indivíduos livres de cárie e cárie-ativos (NAPIMOGA et al., 2004).

Uma associação entre a diversidade de genótipos de *S. mutans* e a cárie dentária foi observada por Alaluusua et al. (1996) ao avaliaram, por ribotipagem, a colonização oral por mais de um tipo clonal de *S. mutans* em seis crianças de 18 a 36 meses de idade com cárie de mamadeira e seis crianças livres desta doença. Os resultados mostraram que as crianças cárie-ativas expostas ao consumo freqüente de sacarose tiveram uma proporção elevada de *S. mutans* na placa dentária e quatro delas (67%) eram colonizadas por mais de um genótipo (dois ou mais clones), enquanto que as crianças livres de cárie tiveram uma proporção baixa de *S. mutans* na placa e somente uma delas (17%) abrigou mais de um genótipo.

Napimoga et al. (2004) relacionaram a diversidade clonal com alguns fatores de virulência dos *S. mutans* em oito indivíduos livres de cárie e oito cárie-ativos de 18 a 29 anos de idade. Os isolados foram submetidos à RAPD e à técnica de eletroforese de enzimas codificadas por multilocus (MLEE) para estabelecer a diversidade genotípica. Os autores observaram um número significativamente maior de genótipos de *S. mutans* nos indivíduos cárie-ativos (44 genótipos distintos; dois a oito por indivíduo) do que nos livres de cárie (24 genótipos distintos; um a quatro por indivíduo).

Rosa et al. (2005) avaliaram a diversidade clonal de *S. mutans*, através da MLEE, em oito indivíduos livres de cárie de 17 a 21 anos de idade, e verificaram a presença de dois ou mais clones diferentes (média de 4,75 clones) colonizando todos os sujeitos, confirmando a premissa de que indivíduos livres de cáries são propensos a serem colonizados por mais de uma cepa de *S. mutans*.

Cogulu et al. (2006) investigaram pela RAPD a diversidade genotípica de *S. mutans* entre crianças de 7 a 12 anos de idade com e sem Síndrome de Down e observaram que os indivíduos com menor prevalência de cárie apresentaram menor variedade clonal dos microrganismos avaliados.

Apesar de não ser o objetivo principal de seu trabalho, Guo et al. (2006) observaram, através da RAPD, que a placa dentária de 73,3% de 20 indivíduos cárie-ativos de 18 a 29 anos de idade eram colonizadas por mais de um genótipo de *S. mutans*.

Rodrigues (2007) avaliou pela RAPD a diversidade genotípica de *S. mutans* em isolados de 20 pré-escolares de quatro a cinco anos de idade, com e sem história de cárie dentária. Dentre os principais resultados, encontrou que 40% e 60% das crianças com cárie dentária apresentaram, respectivamente, três e cinco genótipos de *S. mutans* em suas amostras de saliva. Além disso, verificou uma correlação positiva entre a heterogeneidade genotípica e uma alta severidade da doença.

A literatura também apresenta ausência de associação entre a atividade de cárie e a heterogeneidade genotípica dos *S. mutans*. Mattos-Graner et al. (2001) avaliaram a diversidade clonal de *S. mutans*, pela RAPD em crianças de berçários brasileiros de 12 a 30 meses de idade. Das 24 crianças com dois a cinco isolados, seis (25%) carregavam dois genótipos distintos de *S. mutans* e uma (4,2%) carregava três variedades clonais. Dentre as crianças com cárie dentária, 36,4% eram colonizadas por mais de um genótipo distinto de *S. mutans*, enquanto que 23,1% das crianças sem cárie abrigavam mais de um genótipo. Após a análise dos dados, os autores não encontraram associação significativa entre a diversidade genotípica e a experiência de cárie ou os níveis salivares de EGM.

Da mesma maneira, Longo, Mattos-Graner e Mayer (2003) não encontraram correlação entre a diversidade genotípica e a experiência de cárie ou níveis salivares de EGM, ao analisarem, pela RAPD, isolados clínicos de crianças de 18 a 30 meses de idade livres de cárie e cárie-ativas.

Nascimento, Höfling e Gonçalves (2004) avaliaram o perfil de colonização e a distribuição clonal de *S. mutans* isolados de nove indivíduos de 50 a 75 anos com e sem lesões de cárie de coroa e de raiz. Após determinação do polimorfismo genético, através da RAPD, observou-se que os participantes abrigaram de dois a dez genótipos de *S. mutans* distribuídos aleatoriamente em diferentes locais da cavidade bucal. Os genótipos de *S. mutans* não mostraram nenhuma evidência de variabilidade na colonização de superfícies não cariadas e cariadas dentro do mesmo indivíduo, nem de diferenças etiológicas entre as cáries de coroa e de raiz.

Lembo et al. (2007) genotiparam pela RAPD isolados de *S. mutans* de 10 crianças livres de cárie e de 11 crianças cárie-ativas de cinco a oito anos de idade e também não encontraram diferença estatisticamente significativa entre o número de genótipos detectados nas crianças com e sem cárie dentária, uma vez que em média 2,2 genótipos foram detectados nos indivíduos sem cárie e 2,64 nos cárie-ativos. Sete crianças (33,3%) apresentaram um único genótipo (quatro cárie-ativas e três sem cárie) e 14 crianças (66,6%) exibiram de dois a sete genótipos (sete crianças de cada grupo). Os autores também não observaram correlação entre o número de genótipos e os níveis salivares de EGM.

Liu et al. (2007) investigaram a colonização de *S. mutans* em 56 crianças chinesas de três a quatro anos de idade, freqüentadoras de uma creche-escola, e não encontraram diferença significativa entre a diversidade genotípica de *S. mutans* nos indivíduos com e sem cárie dentária. Os isolados típicos de *S. mutans* foram identificados por métodos microbiológicos clássicos e genotipados pela RAPD e RFLP. Das 35 crianças (62,5%) livres de cárie dentária, três (13%) eram colonizadas com apenas um genótipo e 20 (87%) com mais de um genótipo distinto; enquanto que das 21 crianças com cárie (37,5%), quatro (22,2%) eram colonizadas com somente um genótipo e 14 (77,8%) com mais de um genótipo diferente de *S. mutans*.

Em contrapartida, Kreulen et al. (1997) mostraram uma correlação negativa entre a atividade de cárie e a diversidade genotípica dos *S. mutans* ao avaliarem a diversidade clonal destes microrganismos por RAPD, em sete pares de irmãos, com idade média de 3,7 anos. Todos os pares utilizavam mamadeira açucarada além da necessidade dietética, sendo que uma criança tinha cárie de mamadeira e a outra não. Os indivíduos cárie-ativos abrigaram significativamente mais *S. mutans* do que os controles. No entanto, as crianças sem cárie dentária eram colonizadas por dois a cinco tipos clonais de *S. mutans* e as crianças com cárie por somente um clone.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a diversidade genotípica de *S. mutans* isolados de pré-escolares com e sem assistência odontológica precoce e associá-la a condições e fatores relacionados à cárie dentária.

As hipóteses nulas (H_0) testadas foram de que:

- 1- Não há associação entre experiência de cárie dentária e diversidade genotípica dos *S. mutans*;
- 2- Não há associação entre atividade e severidade da cárie dentária e diversidade genotípica dos *S. mutans*;
- 3- Não há associação entre Índice de Higiene Oral Simplificado (IHOS) e diversidade genotípica dos *S. mutans*;
- 4- Não há associação entre nível salivar de EGM e diversidade genotípica dos *S. mutans*;
- 5- Não há associação entre alguns hábitos de higiene bucal/dieta e diversidade genotípica dos *S. mutans*.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

O projeto deste estudo foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Norte do Paraná, PR (UNOPAR), recebendo parecer favorável a sua execução (Protocolo PP 281/07 - Anexo A), e à apreciação da Direção do Núcleo de Odontologia para Bebês da Universidade Estadual de Londrina (NOB/UEL) e da Diretoria do Centro Municipal de Educação Infantil Valéria Veronesi (Londrina - PR).

Os pais ou responsáveis legais pelos pré-escolares participantes do estudo foram esclarecidos sobre a natureza do trabalho e 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 (Apêndice A) autorizando, portanto, a participação do (a) menor na pesquisa.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo se caracteriza por uma investigação comparativa com delineamento transversal para experiência, severidade e atividade da cárie dentária, IHOS, avaliação do nível salivar e da diversidade genotípica de *S. mutans* e para alguns dados comportamentais relativos a hábitos de higiene bucal e dietéticos de pré-escolares residentes em Londrina - PR e assistidos pelo programa educativo-preventivo do NOB/UEL.

4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população do estudo foi constituída por dois grupos:

Com assistência odontológica precoce (G1): Inicialmente foram alocadas, a partir de sorteio aleatório dos prontuários odontológicos, 20 crianças de cinco anos de idade (60 a 71 meses), de ambos os gêneros, assistidas desde o primeiro ano de vida pelo NOB/UEL. Neste momento, após análise dos critérios de inclusão, abaixo relacionados, detectou-se 15 pré-escolares (75%) sem cárie dentária. Com o intuito de se obter metade da amostra com cárie dentária e com proporções semelhantes quanto à severidade da doença, eliminou-se cinco participantes sem experiência da doença e selecionou-se sucessivamente, também de forma randomizada, mais cinco pacientes com cárie dentária.

Sem assistência odontológica precoce (G2): Os 20 participantes desse grupo foram selecionados entre pré-escolares de uma creche-escola da rede pública de ensino (Centro Municipal de Educação Infantil Valéria Veronesi) a partir de sorteio da lista de frequência escolar e pareados para idade, gênero, experiência e severidade da cárie dentária em relação às crianças do G1 (Tabela 1).

A escolha da faixa etária supracitada baseou-se nas idades índices pré-estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para levantamentos epidemiológicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

Os participantes de ambos os grupos foram recrutados com base nos seguintes critérios: 1) residir em área com nível ótimo de flúor na água, 2) não possuir doença sistêmica e 3) não ter usado medicação que interfira na microbiota bucal em um período de 15 dias antes do estudo.

Tabela 1 - Perfil da população do estudo (n=40)

Características	G1		G2	
	n	%	n	%
Gênero				
Masculino	12	60	12	60
Feminino	8	40	8	40
Total	20	100	20	100
Experiência de cárie				
Sem (ceo-d =0)	10	50	10	50
Com (ceo-d ≥1)	10	50	10	50
Total	20	100	20	100
Severidade da cárie ^A				
Baixa	4	40	4	40
Média	3	30	3	30
Alta	3	30	3	30
Total	10	100	10	100

A = entre as crianças com experiência de cárie dentária (n=10)

4.4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Um questionário (Apêndice B) com questões relativas à saúde geral e bucal da criança, incluindo hábitos de higiene bucal e dietéticos, foi elaborado e validado através da realização de um pré-teste aplicado em um grupo de dez mães escolhidas entre as que freqüentam o NOB/UEL. Optou-se por essas mães pela facilidade de acesso e pela variedade de condições educacionais e sociais que apresentam.

Oficinas de treinamento e calibração para o diagnóstico da cárie dentária foram realizadas com pré-escolares, na faixa etária do estudo, no NOB/UEL, de acordo com os critérios da OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997). A concordância intraexaminador foi verificada em um grupo de 20 crianças, através da realização de exames em duplicata, com intervalos de sete dias entre eles. O teste estatístico do coeficiente *Kappa* foi utilizado para aferição ($K=0,97$), o qual revelou excelente concordância intraexaminador.

4.5 COLETA DOS DADOS

A coleta de todos os dados da pesquisa foi realizada, durante cinco meses consecutivos nas dependências do NOB/UEL, por um único examinador previamente treinado e calibrado.

4.5.1 Entrevista

Foi conduzida uma entrevista direcionada aos pais ou responsáveis pelas crianças com aplicação do questionário validado a fim de levantar dados comportamentais relacionados, principalmente, aos hábitos de higiene bucal e dieta dos menores.

4.5.2 Avaliação da Experiência, Atividade e Severidade da Cárie Dentária

O diagnóstico da cárie dentária foi realizado baseado nos critérios recomendados pela OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997) para determinação do índice ceo-d (número de dentes decíduos cariados, extraídos ou com extração indicada e obturados). Os pré-escolares foram examinados em cadeiras odontológicas, sob luz artificial e com o auxílio de um espelho odontológico plano. Em caso de dúvida, a superfície dentária foi investigada com sonda exploradora de ponta arredondada somente com o objetivo de eliminar detritos situados sobre os dentes e assim melhorar a visualização. As crianças com ceo-d=0 foram definidas como livres de cárie dentária e com ceo-d \geq 1 com experiência da doença.

De acordo com as características clínicas da lesão, as superfícies cariadas foram classificadas em ativas (destruição da superfície com esmalte opaco e dentina

amolecida de coloração clara) ou inativas (destruição da superfície com esmalte brilhante e dentina endurecida e/ou escurecida) (KRAMER, 1997). Desta forma, o pré-escolar foi considerado com ou sem atividade de cárie.

Para o estabelecimento da severidade da doença todos os participantes, de ambos os grupos, foram categorizados de acordo com sua experiência de cárie em: baixa severidade ($ceo-d < 2,6$), média severidade ($2,7 < ceo - d < 4,4$) e alta severidade ($ceo-d > 4,5$) (adaptado de PETERSEN, 2003).

4.5.3 Avaliação do Índice de Higiene Oral Simplificado

Após evidenciação da placa bacteriana com fucsina básica a 2% (Fotografia 1) foram examinadas quatro superfícies dentárias: vestibular do dente 54, vestibular do dente 61, lingual do dente 75 e vestibular do dente 82 (Fotografia 2). Somente os dentes totalmente erupcionados foram considerados e, quando ausentes, foram substituídos por um respectivo adjacente. Os escores para o índice de higiene bucal variaram de zero a três, desta forma cada superfície examinada recebeu um código para o induto, sendo:

- 0 - sem induto
- 1 - induto cobrindo até 1/3 da superfície do dente
- 2 - induto cobrindo mais de 1/3 até 2/3 da superfície do dente
- 3 - induto cobrindo mais de 2/3 da superfície do dente.

Os escores obtidos em cada superfície foram somados e divididos pelo número de dentes examinados (GREENE; VERMILLION, 1964). Para a categorização dos dados, as médias obtidas entre 0 e 1 corresponderam à higiene bucal satisfatória; de 1,1 a 2 regular; e de 2,1 a 3 deficiente (PINTO, 2003).



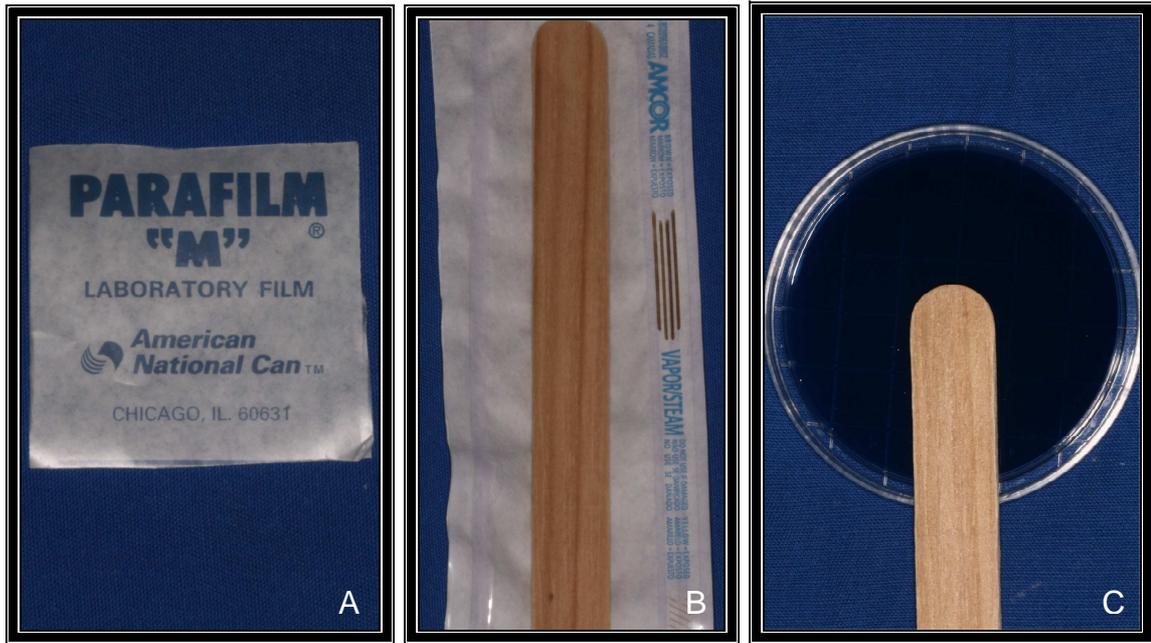
Fotografia 1 - Fucsina básica a 2% utilizada na evidência da placa bacteriana.



Fotografia 2 - Superfícies dentárias coradas e selecionadas para a avaliação do IHOS.

4.5.4 Nível Salivar de EGM

Para a determinação do nível salivar de EGM foi efetuada, inicialmente, uma coleta de amostra de saliva, de acordo com o descrito por Köhler e Bratthal (1979). Solicitou-se que a criança mastigasse um pedaço de Parafilm® “M” (Laboratory Film, American National Can™. Chicago, IL) (Fotografia 3A) de aproximadamente 3x3 cm, durante um minuto. A seguir, cerca de 30 mm da ponta de uma espátula de madeira esterilizada de 150x13 mm (Fotografia 3B) foi introduzida na boca do participante e pressionada dez vezes (cinco vezes de cada lado) sobre o dorso da língua. Ao retirar a espátula, foi solicitado que o participante fechasse os lábios, não encostando os dentes, com a finalidade de reter os excessos de saliva. Em seguida, cada lado da espátula foi pressionado em superfície de ágar mitis-salivarius acrescido de sacarose (15%) e bacitracina (0,2 U/mL), que é um meio seletivo para EGM, além de telurito de potássio a 1% (Solução de Chapman) que é um agente inibidor do crescimento de outros microrganismos que não EGM (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973). Esse meio de cultura foi distribuído em placas do tipo Rodac® de 67X15 mm (Inlab - Interlab Distribuidora de Produtos Científicos Ltda, São Paulo, Brasil) (Fotografia 3C), cuja base é quadriculada permitindo a contagem de colônias. As placas foram acondicionadas em jarras de anaerobiose com chama de vela para a remoção do oxigênio e produção de CO₂, propício para o crescimento de EGM, e incubadas em estufa a 37°C, durante 48 horas.



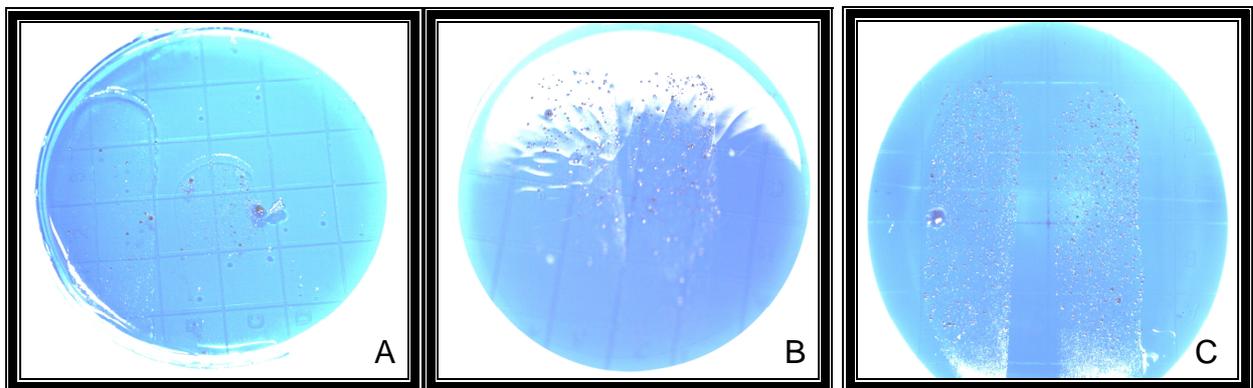
Fotografia 3 - Materiais utilizados na coleta da saliva: (A) Parafilm® "M", (B) espátula de madeira esterilizada e (C) placa tipo Rodac® contendo meio ágar mitis-salivarius acrescido de sacarose (15%), bacitracina (0,2 U/mL) e telurito de potássio (1%).

Após este período foi realizada a contagem das colônias morfológicamente semelhantes aos EGM com o auxílio de um Contador de Colônias Mecânico (CP 602 - Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda, São Paulo, Brasil) (Fotografia 4). A média das unidades formadoras de colônias (UFC), referente à semeadura dos dois lados da espátula, foi categorizada e interpretada com base nos critérios descritos por Köhler e Bratthal (1979):

- 0 - 20 UFC, equivalente a $<10^4$ UFC de EGM por mL de saliva, representando baixo risco de cárie dentária (Fotografia 5A);
- 21 - 100 UFC, equivalente a $10^4 \leq - <10^6$ de EGM por mL de saliva, representando médio risco de cárie dentária (Fotografia 5B);
- >100 UFC, equivalente a $\geq 10^6$ UFC de EGM por mL de saliva, representando alto risco de cárie dentária (Fotografia 5C).



Fotografia 4 - Contador de Colônias Mecânico.

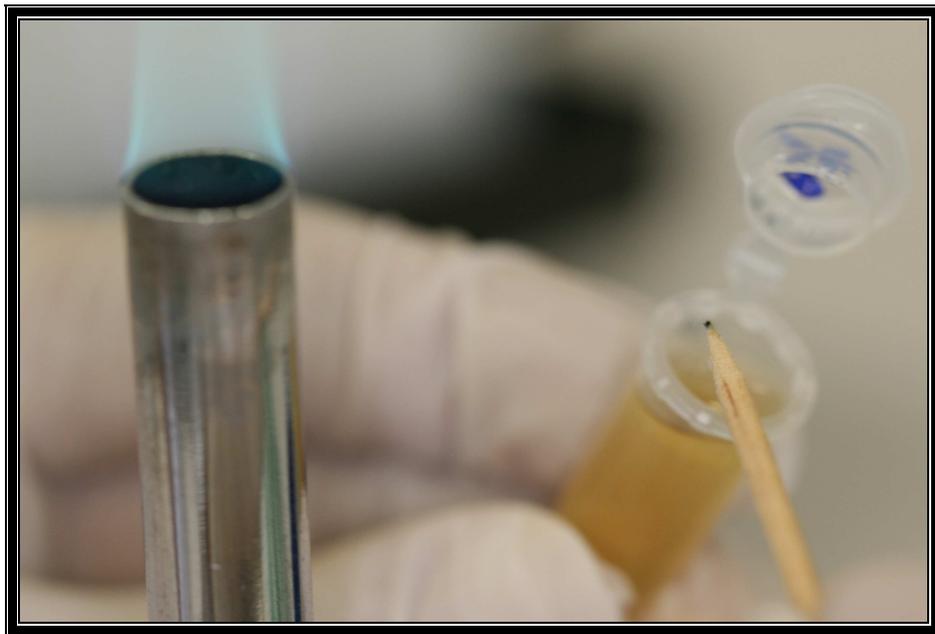


Fotografia 5 - Crescimento microbiano após incubação por 48 horas: baixo risco (A), médio risco (B) e alto risco de cárie dentária (C).

4.5.5 Avaliação da Diversidade Genotípica dos *S. mutans*

4.5.5.1 Extração do DNA cromossômico bacteriano

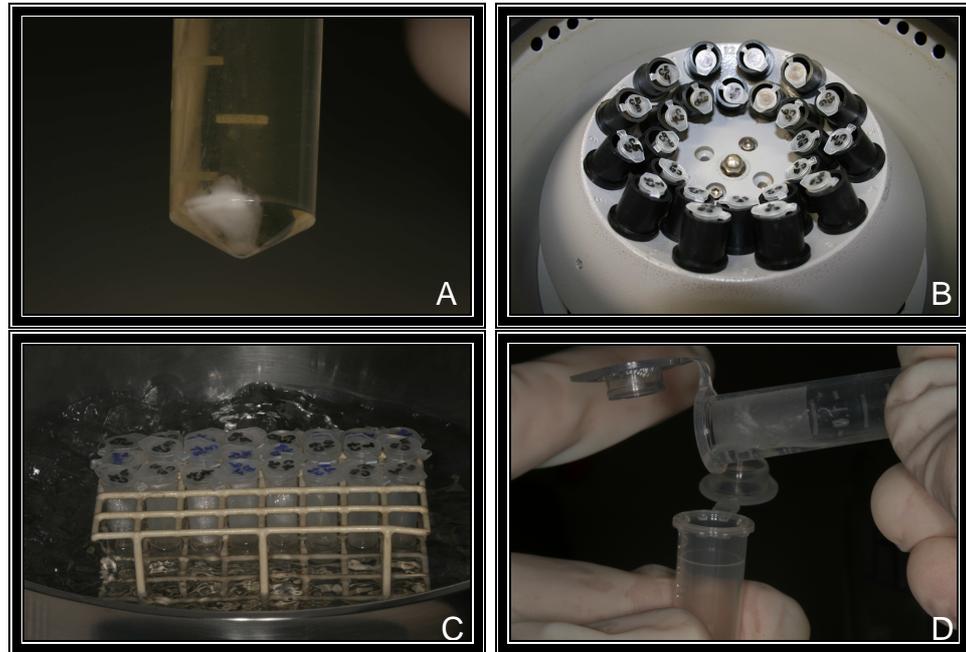
Da placa de cultura de cada criança foram selecionadas, através de características fenotípicas, dez colônias típicas de *S. mutans*. Cada colônia foi transferida assepticamente para um microtubo contendo caldo BHI (Infusão de cérebro e coração - DIFCO Laboratories, Detroit, USA) e incubadas por 24 horas em jarras de anaerobiose com chama de vela à 37°C (Fotografia 6).



Fotografia 6 - Transferência de uma colônia típica de *S. mutans* para o caldo BHI.

A extração do DNA cromossômico das bactérias (Fotografia 7) foi baseada em uma modificação na técnica proposta por Saarela et al. (1996). As células bacterianas crescidas no caldo BHI foram lavadas em 500 μ l de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH=8) e centrifugadas a 10.000 rpm. Este procedimento foi repetido por três vezes e então o pellet de células foi ressuscitado em 500 μ l do tampão TE e fervido por dez minutos a 100°C. O sobrenadante foi coletado após

uma última centrifugação a 10.000 rpm por dez minutos e armazenado por congelamento em freezer a -4°C até posterior confirmação molecular da identidade do *S. mutans* pela PCR e genotipagem pela técnica de RAPD.



Fotografia 7 - Extração do DNA cromossômico bacteriano: (A) crescimento de colônia isolada em caldo BHI, (B) centrifugação a 10.000 rpm por dez minutos, (C) ebulição a 100°C por dez minutos e (D) coleta do sobrenadante.

4.5.5.2 Identificação molecular dos *S. mutans*

Os isolados de EGM foram identificados em relação à espécie *S. mutans* pela PCR com oligonucleotídeos (*primers*) que flanqueiam o gene da glicosiltransferase B (Quadro 1). Este gene codifica a enzima GTFB que participa da síntese de glucanos insolúveis a partir da sacarose (OHO et al., 2000). Desta forma, as amostras que amplificaram o gene *gtfB* foram consideradas como isolados positivos de *S. mutans*.

Quadro 1 - *Primers* utilizados na PCR específica para o gene *gtfB*

Espécie	Primer	Seqüência (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>S. mutans</i>	GTFB-F	ACTACACTTTTCGGGTGGCTTGG	517	Oho et al. (2000)
	GTFB-R	CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC		

A mistura da PCR consistiu de Tampão 10X (Tris HCl 10 mM; KCl 50 mM pH 8,0), MgCl₂ (1,5 mM), cada *primer* específico (GTFB-F e GTFB-R, 1 µM), dNTPs (200 µM), 1 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies[®], 2 µL de amostra do DNA bacteriano em um volume final de 10 µL. Em cada reação utilizou-se uma amostra contendo 1 µL de uma linhagem padrão de *S. mutans* (ATCC 25175) como controle positivo (C⁺) e uma amostra contendo água ultrapura como controle negativo (NO).

As condições da PCR foram realizadas em um termociclador (Multi Gene II - Labnet International, São Paulo, Brasil) com uma desnaturação inicial das fitas de DNA a 95°C por sete minutos, seguida de ciclos subsequentes com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento ou hibridização do *primer* a 59°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por um minuto. Após 29 ciclos, um ciclo final de 95°C por 30 segundos, 59°C por 30 segundos e 72°C por cinco minutos determinou o final da amplificação dos fragmentos de DNA.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese (100 Volts) em gel de agarose 1%, utilizando-se como referência um marcador de massa molecular Ladder de 250 pb (Invitrogen Life Technologies[®], São Paulo, Brasil). Os géis foram corados com brometo de etídeo (5µg/µl) e visualizados sob luz ultravioleta (Model ENF - 280C, Spectroline[®] Long Life[™], New York, USA). A confirmação da identidade molecular do *S. mutans* ocorreu quando foi amplificada uma única banda de 517 pb.

Cada criança participante foi categorizado quanto à quantidade de isolados positivos para o gene *gtfB* em: presença de cinco a sete ou de oito a dez isolados positivos.

4.5.5.3 Determinação da diversidade genotípica dos *S. mutans*

Os isolados especificados como *S. mutans* foram genotipados através da RAPD utilizando-se os *primers* OPA-02 (LI; CAUFIELD, 1998) e OPA-13 (SAARELA et al., 1996) (Quadro 2).

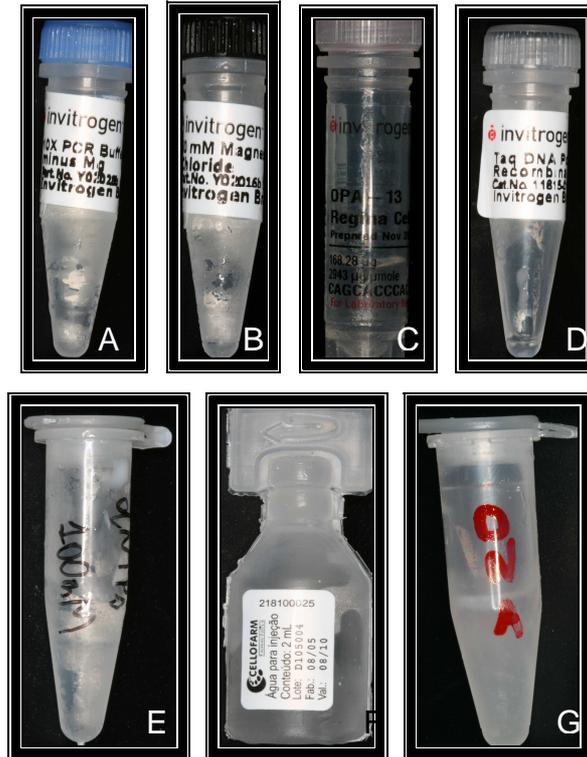
Quadro 2 - *Primers* utilizados nas RAPDs

Primer	Seqüência (5'a 3')	Referência
OPA-02	TGCCGAGCTG	Li e Caufield (1998)
OPA-13	CAGCACCCAC	Saarela et al. (1996)

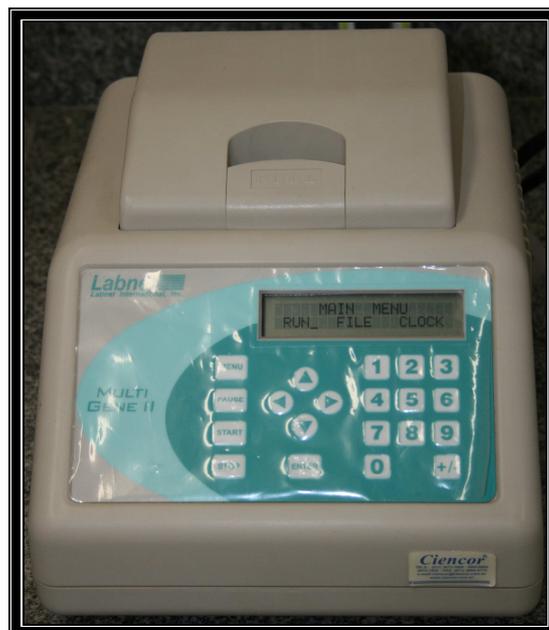
As reações da RAPD utilizando-se o *primer* OPA-02 foram conduzidas em uma mistura contendo 5 µL de Tampão 10X (Tris HCl 100 mM; KCl 500 mM pH 8,0), MgCl₂ (7 mM), *primer* (1 µM), 200 mM de cada dNTP, 2,5 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies[®], São Paulo, Brasil) e 2,5 µL de amostra do DNA bacteriano.

A mistura da RAPD para o *primer* OPA-13 consistiu de Tampão 1X (Tris HCl 10 mM; KCl 50 mM pH 8,0), MgCl₂ (3,5 mM), *primer* (0,4 mM), dNTPs (0,2 mM) e 2,5 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies[®], São Paulo, Brasil) e 2,5 µL de amostra do DNA bacteriano. Nas reações de RAPD também foram utilizadas amostras de controles positivo (ATCC 25175) e negativo (água ultrapura) (Fotografia 8).

As amplificações, para ambos os *primers*, foram efetuadas em um termociclador (Multi Gene II - Labnet International, São Paulo, Brasil) (Fotografia 9) através da seguinte programação: pré-desnaturação a 94°C por cinco minutos, seguida de 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 36°C por 30 segundos e extensão a 72°C por um minuto, concluindo com extensão a 72°C por sete minutos.

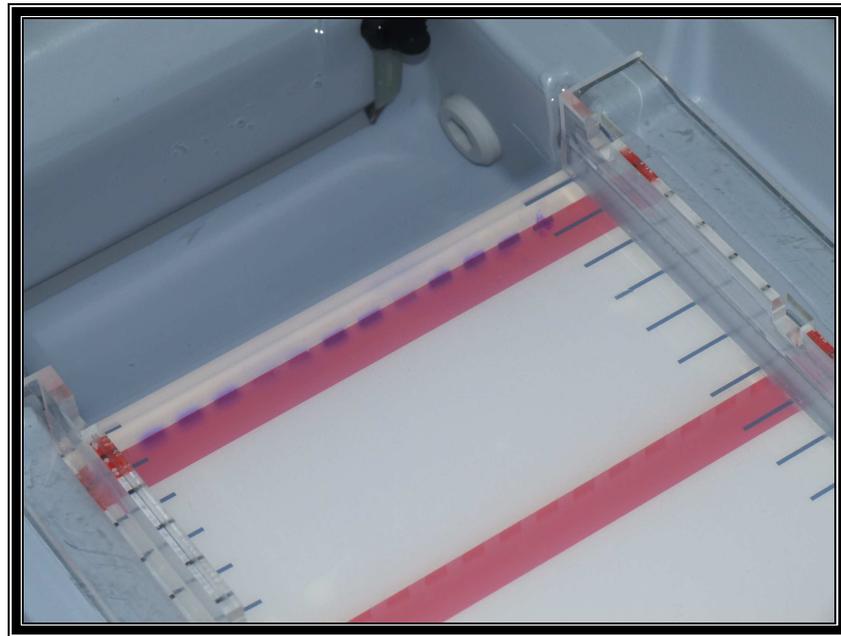


Fotografia 8 - Reagentes das RAPDs: (A) Tampão, (B) $MgCl_2$, (C) *Primer*, (D) Taq DNA polymerase, (E) dNTPs, (F) água ultrapura e (G) amostra de DNA bacteriano.



Fotografia 9 - Termociclador utilizado nas reações.

Os produtos das reações foram separados por eletroforese (80 Volts) em gel de agarose 2% e tampão Tris-Borato - EDTA (0,5X - pH 8,0) (Fotografia 10), utilizando-se como referência um marcador de massa molecular Ladder de 100pb (Invitrogen Life Technologies[®], São Paulo, Brasil). Os géis foram corados com brometo de etídeo (5µg/µl) e visualizados sob luz ultravioleta (Model ENF - 280C, Spectroline[®] Long Life[™], New York, USA) (Fotografia 11).



Fotografia 10 - Eletroforese em gel de agarose (2%) e tampão Tris-Borato - EDTA (0,5X - pH 8,0).

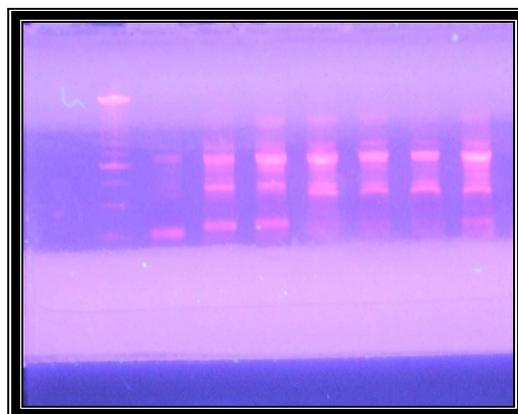


Figura 11 - Visualização sob luz ultravioleta dos produtos amplificados pela RAPD.

As imagens obtidas foram capturadas por uma câmera digital (Canon EOS Rebel Xti + lente Canon EF 10 mm F2.8 Macro USM) e as análises dos padrões de bandas foram feitas por comparação visual. Amplicons foram considerados similares quando todas as bandas principais apresentaram-se idênticas e as bandas secundárias não apresentaram mais que duas diferenças de posicionamento. As bandas de DNA identificadas para cada uma das amostras foram utilizadas para a construção de uma matriz binária, na qual o valor zero representou a ausência da banda de DNA para a linhagem analisada e um, a presença da banda de DNA. Esta matriz foi analisada usando o Coeficiente de Dice, o qual não considera as similaridades negativas, isto é, a ausência do produto. A escala de valores deste coeficiente varia de zero, para dissimilaridade total, a um para similaridade total entre as linhagens. A matriz de coeficientes de similaridade genética gerada foi utilizada na obtenção de agrupamento pelo método UPGMA, para a construção de dendrogramas utilizando o programa de computador NTSYS-PC (ROHLF, 2000).

Após a determinação da média da quantidade de diferentes genótipos de *S. mutans* presentes na cavidade bucal dos pré-escolares, os mesmos foram categorizados da seguinte forma:

- Menor diversidade genotípica: abaixo da média encontrada nos grupos;
- Maior diversidade genotípica: acima da média encontrada nos grupos.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma vez realizada a coleta dos dados os mesmos foram codificados para todas as variáveis e categorias estudadas, possibilitando a elaboração de um banco de dados.

Para as análises bivariadas foram utilizados os testes do qui-quadrado (χ^2), Mann-Whitney e a correlação de Spearman trabalhando-se com um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 VARIÁVEIS CLÍNICAS E COMPORTAMENTAIS E IDENTIFICAÇÃO DOS *S. mutans*

Participaram do estudo 40 pré-escolares de cinco anos de idade ($\bar{X} = 67$ meses de idade), sendo 20 com assistência odontológica desde o primeiro ano de vida (G1) e 20 sem assistência odontológica precoce (G2). Com o objetivo de tornar a amostra o mais homogênea possível, os participantes foram selecionados quanto à experiência de cárie dentária obtendo-se proporções idênticas, em ambos os grupos, de crianças livres de cárie e com história da doença (50%). Em relação à severidade da cárie buscou-se obter proporções semelhantes entre as categorias, sendo observado a presença de 40% das crianças com baixa severidade da doença e a mesma proporção para média e alta severidade (30%).

Os valores do índice ceo-d encontrados, respectivamente, no G1 e no G2 foram $1,75 \pm 2,45$ e $2,10 \pm 2,70$. Como os dados referentes à prevalência da cárie dentária não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste de Mann-Whitney para comparar as populações estudadas e não foi observada diferença estatisticamente significativa. O Gráfico 1 compara entre os grupos a mediana e os respectivos quartis do índices ceo-d.

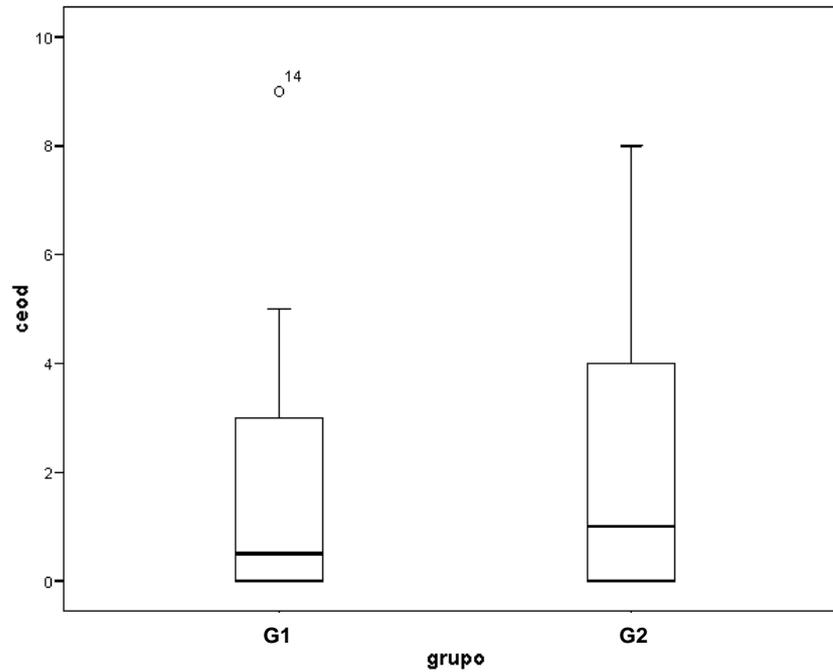


Gráfico 1 - Mediana e quartis do índice ceo-d entre os pré-escolares do G1 e G2.

Adicionalmente, a análise individual dos componentes do ceo-d revelou uma maior freqüência de distribuição de dentes obturados no G1 do que no G2 (Gráfico 2).

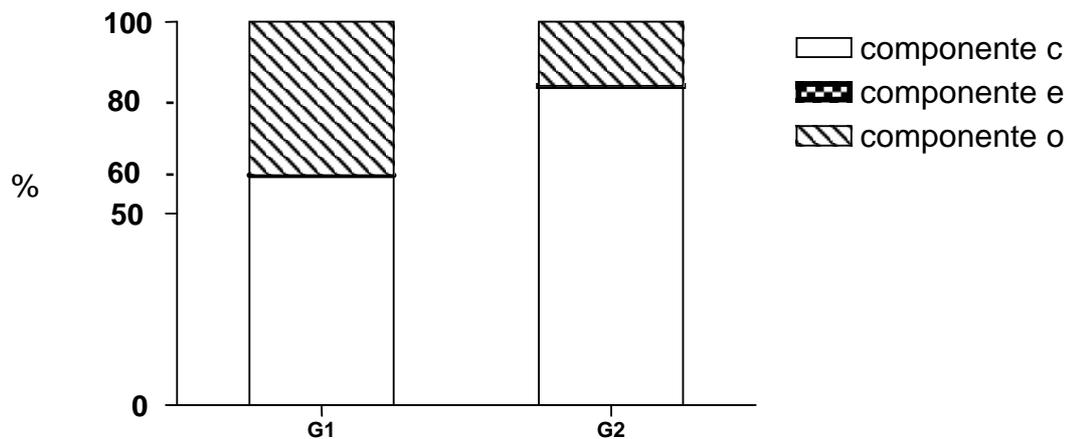


Gráfico 2 - Composição do índice ceo-d no G1 e G2.

Com relação à atividade da doença e IHOS as proporções das categorias determinadas foram estatisticamente semelhantes em ambos os grupos, sendo que a maioria dos pré-escolares apresentou lesões de cárie ativas e higiene bucal regular. Quanto ao risco de cárie dentária, representado pelo nível salivar EGM, houve uma diferença estatisticamente significativa ($P=0,025$) entre os dois grupos e a maioria dos pré-escolares do G1 apresentaram menos de 20 UFC de EGM (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequências absoluta (n) e relativa (%) das categorias relacionadas à atividade de cárie dentária, IHOS e nível salivar de EGM entre pré-escolares com e sem assistência odontológica precoce (n=40)

	G1		G2	
	n	%	n	%
Atividade de cárie ^A				
Não	4	40	3	30
Sim	6	60	7	70
Total	10	100	10	100
IHOS				
Deficiente	6	30	8	40
Regular	13	65	12	60
Satisfatória	1	5	0	0
Total	20	100	20	100
Nível salivar de EGM (Risco)*				
Baixo	11	55	3	15
Médio	5	25	10	50
Alto	4	20	7	35
Total	20	100	20	100

A = entre as crianças com experiência de cárie dentária (n=10)

Teste do χ^2 ; * $P < 0,05$

A Tabela 3 apresenta a análise estatística de algumas variáveis comportamentais entre G1 e G2. Em relação ao uso persistente de mamadeira noturna observou-se que a maioria dos pré-escolares, de ambos os grupos, não mamava durante a noite. No entanto, diferenças estatisticamente significantes foram observadas quando se comparou entre os grupos os hábitos de higiene bucal: número de escovação dentária ($P=0,009$) e uso do fio dental ($P=0,002$). Enquanto que 65% das crianças atendidas pelo programa educativo-preventivo escovavam os dentes três ou mais vezes ao dia e 55% utilizavam o fio dental, 70% das crianças do G2 realizavam a higiene bucal em dois momentos diários e 90% não faziam uso do fio dental.

Tabela 3 - Frequências absoluta (n) e relativa (%) sobre a utilização de mamadeira noturna, número de escovação dentária e uso de fio dental entre pré-escolares com e sem assistência odontológica precoce (n=40)

	G1		G2	
	n	%	n	%
Mamadeira noturna				
Não	18	90	14	70
Sim	2	10	6	30
Total	10	100	10	100
Número de escovação dentária por dia*				
1	2	10	2	10
2	5	25	14	70
3 ou mais	13	65	4	20
Total	20	100	20	100
Fio dental*				
Não	9	45	18	90
Sim	11	55	2	10
Total	20	100	20	100

Teste do χ^2 ; * $P < 0,05$

Foi detectada a presença de *S. mutans* na cavidade bucal de todas as crianças participantes do estudo. No entanto, do total de 400 isolados analisados, 339 (84,75%) apresentaram amplificação positiva para o gene *gtfB*, caracterizando a espécie *S. mutans*.

Conforme pode ser observado na Tabela 4, foi encontrada diferença estatisticamente significativa, em ambos os grupos, em relação à quantidade de colônias identificadas como *S. mutans* onde a maioria dos pré-escolares abrigaram de oito a dez isolados positivos para o gene *gtfB* ($P < 0,04$). Entretanto não houve associação entre o número de isolados positivos e a experiência de cárie.

Tabela 4 - Distribuição do número de isolados positivos de *S. mutans* entre pré-escolares com e sem cárie dentária do G1 e G2 (n=40)

Quantidade de Colônias Positivas	G1		G2	
	n		n	
	Sem Cárie	Com Cárie	Sem Cárie	Com Cárie
De 5 a 7	4	1	3	3
De 8 a 10*	6	9	7	7
Total	10	10	10	10

Teste do χ^2 ; * $P < 0,05$

Os produtos da amplificação por meio da PCR para o gene *gtfB*, em uma criança com cárie dentária do G1, podem ser visualizados na Figura 1.

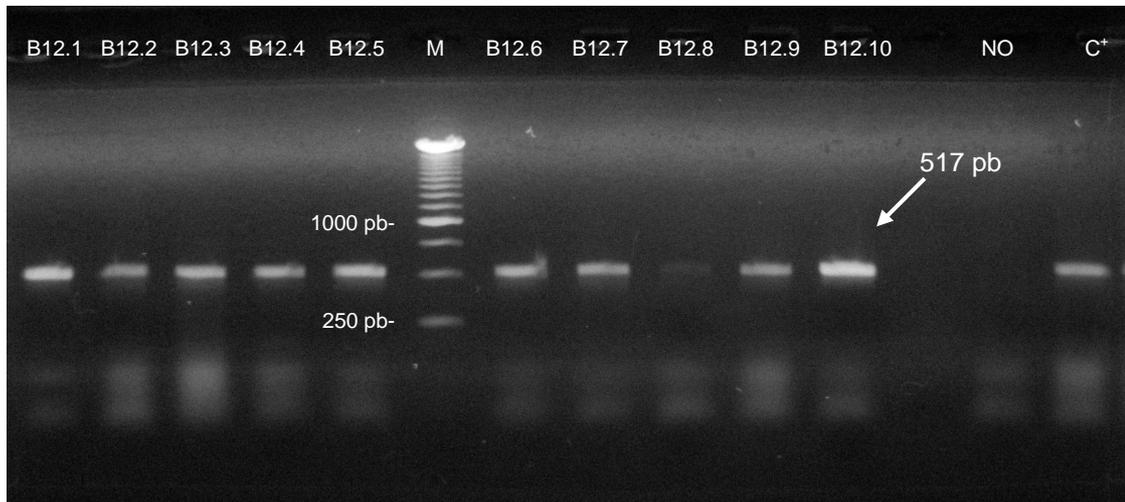


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose da amplificação pela PCR do gene *gtfB* de *S. mutans* isolados da cavidade bucal de pré-escolar com cárie dentária. A seta indica a presença do fragmento de 517 pb referente ao gene da glicosiltransferase B. M=marcador de peso molecular (250 pb Ladder), C+=controle positivo da PCR e NO=controle negativo da PCR.

5.2 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENOTÍPICA DOS *S. mutans*

Foram avaliados, quanto à diversidade genotípica, 173 isolados de *S. mutans* de pré-escolares pertencentes ao G1 e 166 isolados de *S. mutans* das crianças do G2. Deste universo, foram identificados 75 diferentes genótipos de *S. mutans* no G1 (Figura 2) e 73 no G2 (Figura 3) quando se combinou os padrões de RAPD obtidos com os dois *primers*.

Através da análise do dendrograma comparativo da diversidade genotípica de *S. mutans* entre as crianças com e sem assistência odontológica precoce foram observados 22 (29%) genótipos exclusivos do G1 e 51 (70%) exclusivos do G2 (Figura 4).

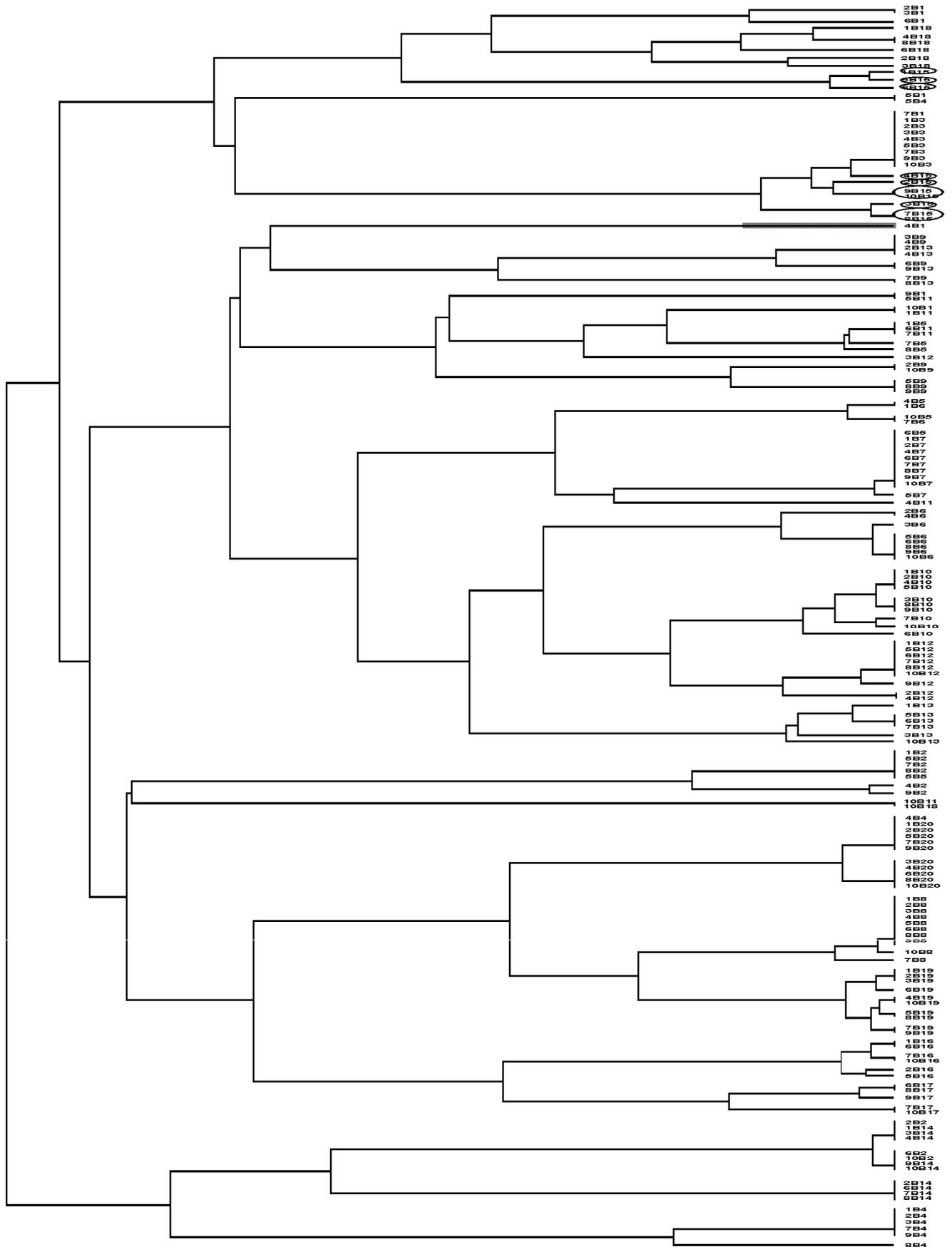
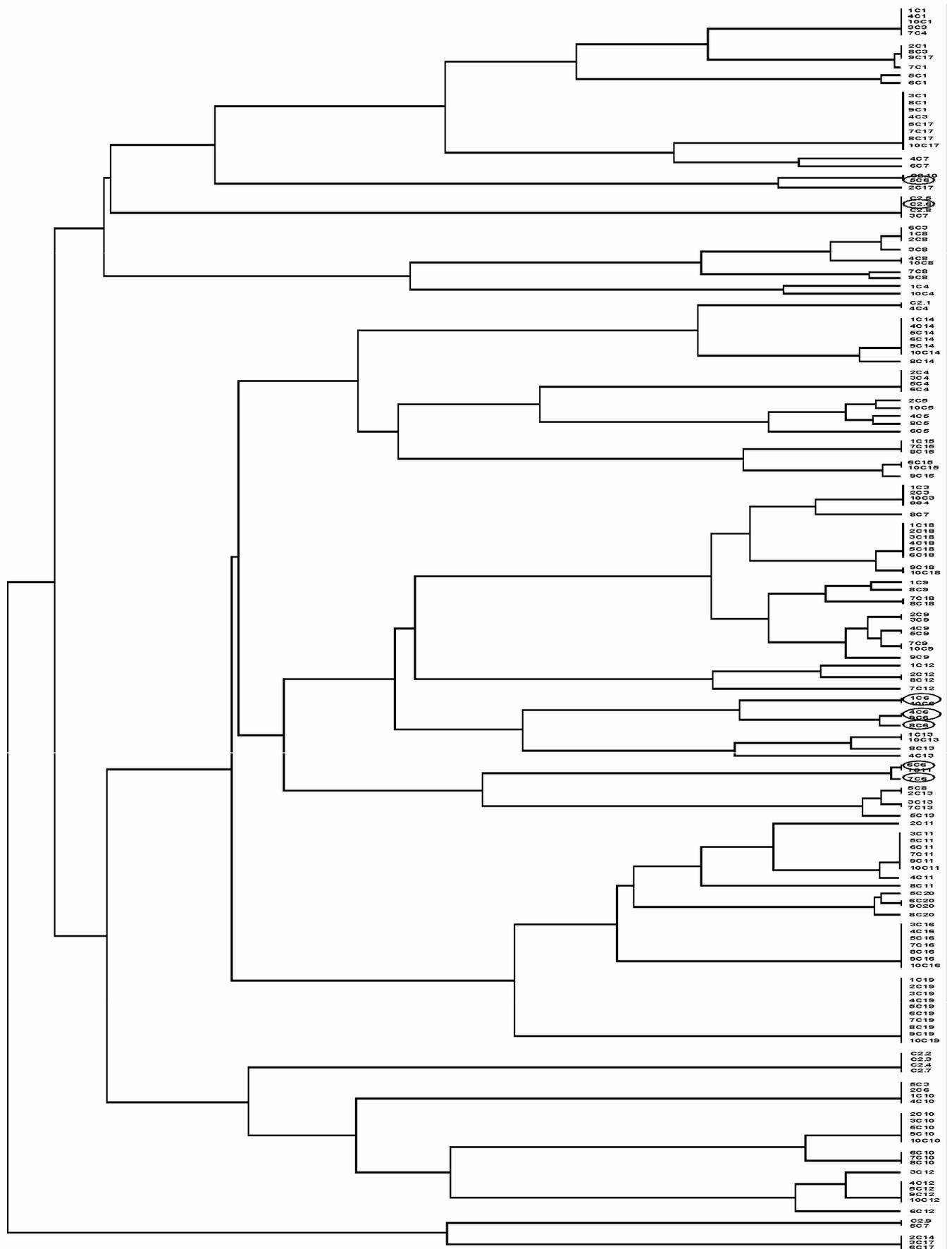


Figura 2 - Dendrograma baseado nos perfis de RAPD ilustrando a diversidade genotípica de *S. mutans* isolados de pré-escolares do G1. Em destaque a presença de oito genótipos distintos de *S. mutans* isolados da criança B15 com cárie dentária.



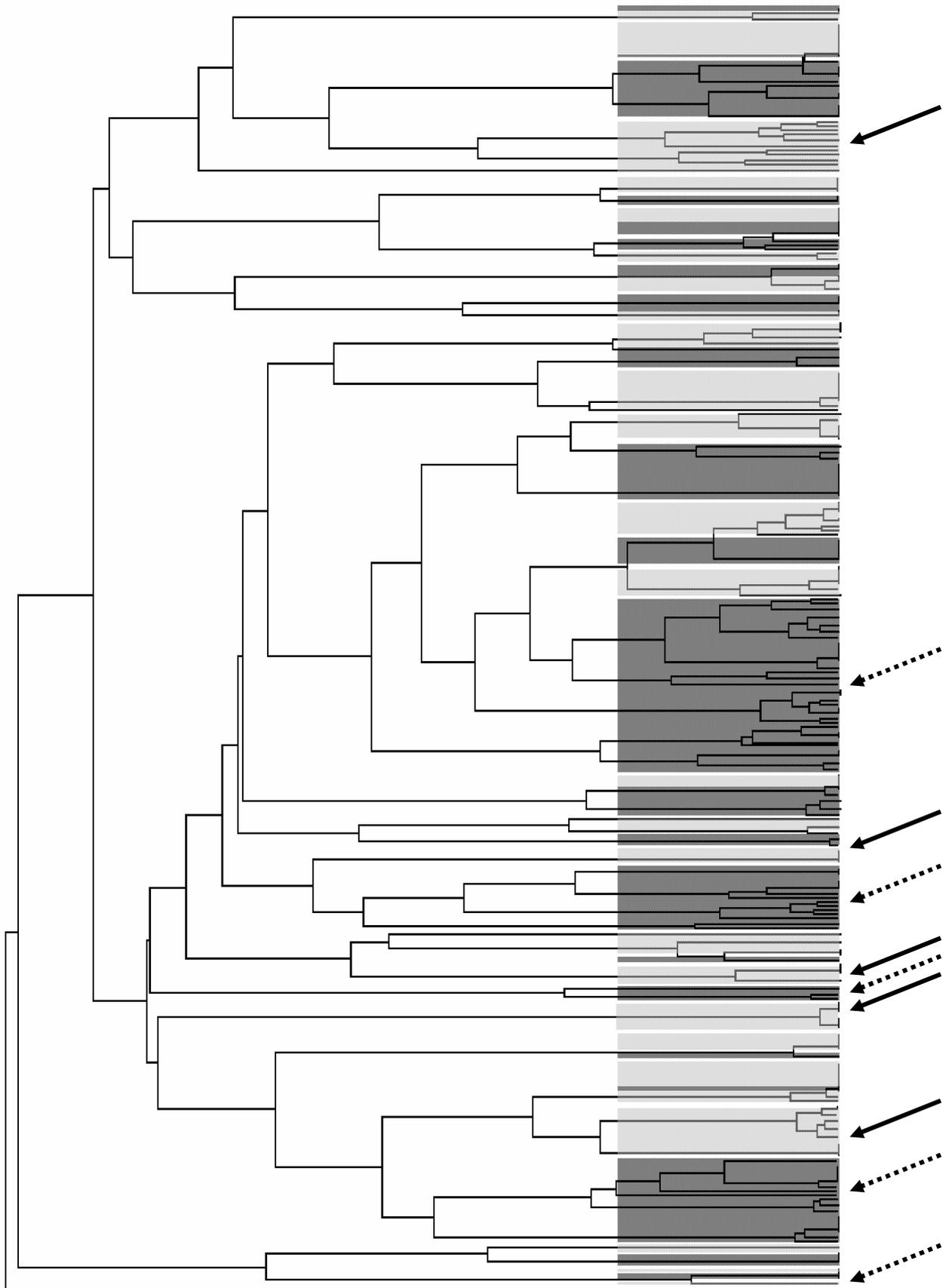


Figura 4 - Dendrograma baseado nos perfis de RAPD ilustrando a diversidade genotípica de *S. mutans* entre os pré-escolares do G1 e G2. As setas cheias indicam a presença dos segmentos contendo os 22 genótipos de *S. mutans* exclusivos do G1 e as setas pontilhadas indicam os 51 genótipos de *S. mutans* exclusivos do G2.

As crianças com assistência odontológica desde o primeiro ano de vida abrigaram de um a oito genótipos distintos de *S. mutans* ($\bar{X}=3,75$) em sua cavidade bucal enquanto que os pré-escolares do G2 eram colonizados por um a sete genótipos ($\bar{X}=3,65$). Vale ressaltar que um participante (5%) do G1 e dois (10%) do G2 apresentaram somente um genótipo de *S. mutans*.

Baseando-se nos resultados acima descritos, os pré-escolares foram categorizados de acordo com o número de diferentes genótipos de *S. mutans* presentes em sua cavidade bucal em:

- Menor diversidade genotípica: um a quatro genótipos diferentes de *S. mutans*;
- Maior diversidade genotípica: cinco a oito genótipos diferentes de *S. mutans*.

Não houve associação estatisticamente significativa entre o número de isolados positivos de *S. mutans* avaliados e sua diversidade genotípica (G1: $P=0,604$; G2: $P=0,217$).

A Figura 5 mostra um exemplo da variedade de genótipos de *S. mutans* identificados através do perfil de bandas amplificadas com os *primers* OPA-02 e OPA-13 em um pré-escolar com cárie dentária do G1. O *primer* OPA-2 gerou produtos de RAPD de tamanhos entre 1400 e 250 pb enquanto que o *primer* OPA-13 gerou fragmentos entre 1500 e 300 pb. A comparação dos genótipos foi realizada pelo processamento simultâneo dos perfis obtidos dos isolados.

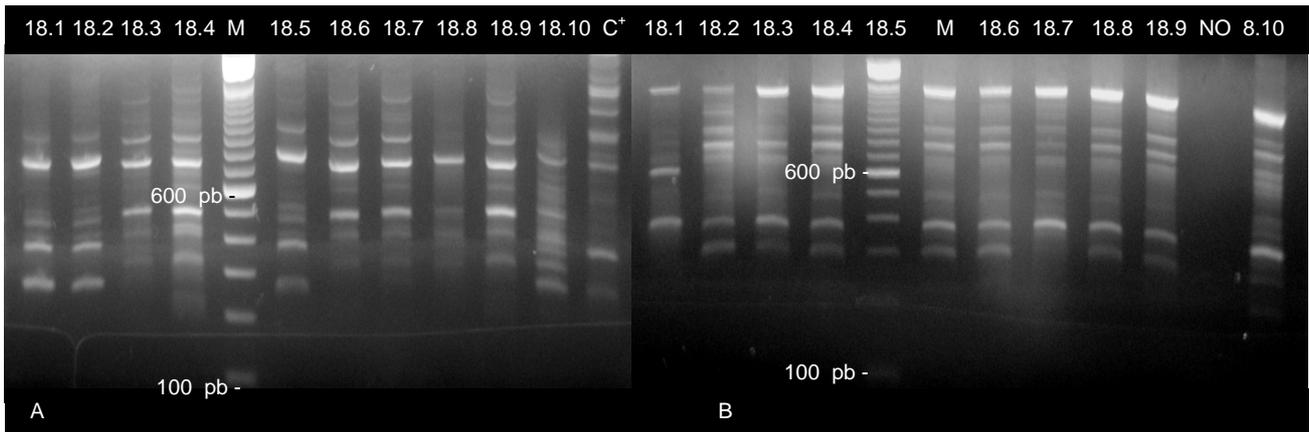


Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por RAPD utilizando os primers OPA-02 (A) e OPA-13 (B). M=marcador de peso molecular (DNA Ladder 100 pb), C+=controle positivo da RAPD e NO=controle negativo da RAPD.

Os resultados referentes à associação entre a diversidade genotípica dos *S. mutans* e experiência, severidade e atividade de cárie dentária nos G1 e G2 estão apresentados na Tabela 5. Foram observadas uma associação estatisticamente significativa ($P=0,021$) e uma moderada correlação ($r=0,503$) entre a diversidade genotípica dos *S. mutans* e a experiência de cárie no G1.

Quanto à associação entre a diversidade genotípica dos *S. mutans*, o IHOS e o nível salivar de EGM nas crianças dos grupos estudados, não foi verificada diferença estatisticamente significativa (Tabela 6).

Também não se observou associação significativa entre as variáveis comportamentais avaliadas e a diversidade genotípica dos *S. mutans* em ambos os grupos (Tabela 7).

Tabela 5 - Diversidade genotípica dos *S. mutans*, experiência, severidade e atividade de cárie dentária no G1 e G2 (n=40)

		Diversidade genotípica		P
		Menor diversidade n	Maior diversidade n	
Experiência de cárie				
G1*	Sem cárie	7	3	0,021
	Com cárie	2	8	
G2	Sem cárie	4	6	0,653
	Com cárie	5	5	
Severidade da cárie ^A				
G1	Baixa	1	3	0,857
	Média	0	3	
	Alta	1	2	
G2	Baixa	1	3	0,279
	Média	2	1	
	Alta	2	1	
Atividade de cárie ^A				
G1	Não	1	3	0,749
	Sim	1	5	
G2	Não	1	2	0,487
	Sim	4	3	

A = entre as crianças com experiência de cárie dentária (n=10)
 Teste do χ^2 ; * $P < 0,05$

Tabela 6 - Diversidade genotípica dos *S. mutans*, IHOS e nível salivar de EGM no G1 e G2 (n=40)

		Diversidade genotípica		<i>P</i>
		Menor Diversidade	Maior Diversidade	
		n	n	
IHOS				
G1	Deficiente	3	3	0,540
	Regular	6	7	
	Satisfatória	0	1	
G2	Deficiente	4	4	0,721
	Regular	5	7	
	Satisfatória	0	0	
Nível salivar de EGM (Risco)				
G1	Baixo	4	7	0,525
	Médio	3	2	
	Alto	2	2	
G2	Baixo	2	1	0,245
	Médio	5	5	
	Alto	2	5	

Tabela 7 - Diversidade genotípica dos *S. mutans*, utilização de mamadeira noturna, número de escovação dentária e uso de fio dental no G1 e G2 (n=40)

		Diversidade genotípica		P
		Menor Diversidade n	Maior Diversidade n	
Mamadeira noturna				
G1	Não	9	9	0,109
	Sim	0	2	
G2	Não	7	7	0,489
	Sim	2	4	
Número de escovação dentária por dia				
G1	1	2	0	0,202
	2	2	3	
	3 ou mais	5	8	
G2	1	1	1	0,464
	2	7	7	
	3 ou mais	1	3	
Fio dental				
G1	Não	5	4	0,403
	Sim	4	7	
G2	Não	8	10	0,884
	Sim	1	1	

6 DISCUSSÃO

6.1 VARIÁVEIS CLÍNICAS E COMPORTAMENTAIS

A manutenção da saúde bucal da população infantil tem se constituído em um compromisso da odontologia atual. A aplicação do conceito de atendimento odontológico precoce proporcionou o desenvolvimento da odontologia para bebês e, por conseguinte, a implantação de centros de atenção a essa população. O Núcleo de Odontologia para Bebês da Universidade Estadual de Londrina (NOB/UEL), oficialmente inaugurado em março de 1986, é reconhecidamente a primeira Clínica Odontológica para Bebês e sua filosofia tem inspirado outros projetos por todo o mundo. Suas ações são voltadas a promoção, prevenção, recuperação, controle e manutenção da saúde bucal em crianças de zero a cinco anos de idade, sendo referência nacional e internacional em sua área de atuação (BEBÊ CLÍNICA - UEL, 2008). Até primeiro de outubro de 2008 constavam em seus registros 17.426 crianças cadastradas no programa de atenção em saúde bucal com assistência odontológica periódica através de práticas educativo-preventivas e curativas.

Um levantamento epidemiológico realizado pela Autarquia Municipal de Saúde de Londrina (2004) apontou que 63,9% da população na faixa etária dos cinco aos seis anos de idade era livre de cárie, contrastando com os resultados nacionais obtidos do projeto Saúde Bucal Brasil - 2003 onde aos cinco anos de idade quase 60% dos pré-escolares brasileiros apresentavam experiência da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Desta forma, os dados referentes à condição de saúde bucal das crianças assistidas pela Bebê Clínica da UEL são extremamente relevantes; 71,1% dos pré-escolares não tem experiência de cárie (PINTO, 2003), atingindo assim a meta proposta pela OMS para o ano 2000, a qual preconizava 50% da população livre da doença entre cinco e seis anos de idade. No entanto, o fato de uma parcela das crianças desta faixa etária ainda apresentarem experiência da doença, mesmo atendidas pelo programa desde o primeiro ano de vida, desperta a atenção para a necessidade de estudos acerca dos fatores de risco e etiológicos associados à cárie dentária.

Torna-se importante enfatizar que a frequência de crianças sem cárie dentária inicialmente encontrada no presente trabalho (75%) foi bastante semelhante à detectada por Pinto (2003). Assim sendo, a metade dos participantes do G1 livres de cárie não reflete a realidade do programa educativo-preventivo em virtude da seleção da população do estudo visar, propositalmente, a obtenção de grupos com quantidade idêntica de indivíduos com e sem a doença.

De acordo com dados do Ministério da Saúde (2004) aos cinco anos de idade as crianças brasileiras apresentam quase três dentes atingidos pela cárie dentária ($ceo-d=2,8$). Neste estudo, o índice $ceo-d$ do G1 ($ceo-d=1,75$) foi abaixo da média nacional, estatisticamente semelhante ao G2 e acima dos valores médios encontrados na população londrinense ($ceo-d=1,38$; AUTARQUIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE LONDRINA, 2004) e daqueles observados em um estudo anterior entre 466 crianças pertencentes a mesma instituição ($ceo-d=0,7$; PINTO, 2003). O resultado encontrado seria consequência do fato de 30% da população selecionada apresentar alta severidade da doença e devido ao baixo número de crianças examinadas, com base na informação de que o tamanho da amostra para estudos epidemiológicos sobre a prevalência da cárie dentária deveria ser calculado levando em consideração estimativas prévias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Diferentemente do G1, as crianças com experiência de cárie dentária e sem assistência odontológica precoce apresentaram aproximadamente 84% dos dentes cariados, resultado próximo aos dados nacionais em que houve um predomínio (80%) do componenteariado entre os dentes com história da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Mesmo sendo protocolo clínico do programa educativo-preventivo a aplicação semestral de solução cariostática (Fluoreto de diamino de prata - Safluoride di Walter[®] 30%) na superfície oclusal dos molares decíduos, 60% das crianças com experiência de cárie dentária apresentaram lesões ativas. Este dado indica não apenas a necessidade de reforço do tratamento interceptor, visando a paralisação da lesão, como uma necessidade atual de se instituir procedimentos restauradores.

Como a maioria dos pré-escolares apresentou higiene bucal regular, os resultados deste estudo também apontam a necessidade de reforçar

constantemente a importância do controle do biofilme dentário, seja por orientações verbais durante as consultas clínicas ou por escovação supervisionada após evidenciação da placa bacteriana.

O caráter randomizado da seleção da população do estudo pode ter influenciado a distribuição de fatores não controláveis entre os grupos. Da mesma forma, o perfil semelhante entre os participantes dos grupos estudo e controle quanto à atividade da doença e IHOS provavelmente minimizaram a variação de fatores clínicos e biológicos que pudessem afetar uma comparação posterior.

A variável comportamental avaliada e relacionada à dieta foi quanto ao uso persistente de mamadeira noturna, visto que este hábito tem sido considerado um dos principais fatores de risco à cárie precoce da infância (RAMALINGAM; MESSER, 2004). Além disso, o Guia de Orientação para Saúde Bucal nos Primeiros Anos de Vida do Conselho Regional de Odontologia do Paraná (2008), elaborado pela Associação Brasileira de Odontopediatria em parceria com a Sociedade Brasileira de Pediatria, não recomenda o uso da mamadeira e enfatiza que se utilizada deveria ser limitada ao primeiro ano de vida. Fraiz (1996) acrescenta que o consumo freqüente de sacarose garante aos EGM substrato para a produção de glucanos extracelulares insolúveis e para a diminuição do pH da placa dentária em um nível em que sua capacidade acidúrica representa uma significativa vantagem ecológica.

Com base nestas informações preocupa o fato de que mesmo com acesso a informações e a consultas periódicas, o uso de mamadeira durante a noite ainda foi observado aos cinco anos de idade em duas crianças do G1, realçando a dificuldade em sensibilizar as famílias na remoção de hábitos nocivos à saúde bucal.

Da mesma forma, a instalação de hábitos de higiene bucal como o uso do fio dental ainda requer maior atenção, pois quase a metade desses pré-escolares não realizam a limpeza das faces dentárias interproximais.

Apesar da maioria das crianças do G1 escovarem os dentes três ou mais vezes ao dia, uma pequena parcela apresentou higiene bucal satisfatória, corroborando o princípio de que nem toda a escovação reduz suficientemente o biofilme das superfícies dentárias, sendo mais importante a qualidade de como ela é

feita do que o número de vezes que esse procedimento é realizado (ARDENGI et al., 2005; MALTZ ; PAROLO; JOBIM, 2005).

6.2 IDENTIFICAÇÃO DOS *S. mutans*

As diferenças referentes a receber assistência odontológica desde o primeiro ano de vida começaram a ser significantes do ponto de vista microbiológico a partir da análise quantitativa de EGM na saliva (risco de cárie dentária), sinalizando uma possível diferenciação na microbiota dos pré-escolares. Entretanto, apesar da maioria das crianças participantes do programa educativo-preventivo abrigarem menos microrganismos do que as do G2, na etapa de identificação molecular das colônias foi observado maior número de isolados geneticamente pertencentes à espécie *S. mutans* no G1. Este resultado confirma a dificuldade da taxonomia por fenotipagem em identificar positivamente algumas cepas de uma espécie para uma determinada característica (LI et al., 2001b) e a eficácia da detecção genética de *S. mutans* pela PCR em amostra de saliva humana (OHO et al., 2000).

Sugere-se que a prevalência de cárie dentária esteja mais relacionada à capacidade de linhagens específicas de *S. mutans* sintetizarem polissacarídeos extracelulares, através das glicosiltransferases, do que suas proporções no biofilme dentário (MATTOS-GRANER et al., 2000), pois a produção dessas enzimas é considerada um importante fator de virulência pelo aumento da aderência e acúmulo dos microrganismos (MATTOS-GRANER et al., 2004).

A detecção de *S. mutans* nas crianças avaliadas, tanto através de características fenotípicas de crescimento em meio ágar mitis-salivarius quanto da identificação molecular pela amplificação positiva do gene *gtfB*, confirmam a premissa de que tais microrganismos são amplamente distribuídos não somente em populações com moderada ou alta prevalência de cárie dentária, mas também em populações apresentando nenhuma ou baixa experiência da doença (AMOROSO et al., 2004; MATEE et al., 1993; OKADA et al., 2002). Portanto, levando em consideração a etiologia multifatorial da cárie dentária, apenas a presença dos *S.*

mutans na saliva ou placa dentária não implica a ocorrência da doença (BRATTHALL, 1992), justificando a identificação genética desses microrganismos na cavidade bucal de pré-escolares com e sem cárie dentária.

Klein et al. (2004) realizaram um estudo longitudinal sobre a transmissão, diversidade e estabilidade genotípica de *S. mutans* em 16 pares mãe-criança e detectaram o microrganismo em todos os indivíduos. Dos isolados das crianças, 90.2% foram identificados como *S. mutans*, valores comparáveis aos resultados encontrados neste estudo.

Apesar de não ter sido observada diferença estatisticamente significativa, quase a totalidade das crianças do G1 que apresentaram de cinco a sete isolados positivos para *S. mutans* eram livres de cárie. Tal constatação não foi observada no G2, sugerindo que no G1 houve uma colonização concomitante por outros estreptococos menos cariogênicos.

6.3 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENOTÍPICA DOS *S. mutans*

Estudos genético-moleculares apontam uma intensa diversidade genotípica de *S. mutans* (KAMIYA et al., 2005; KLEIN et al., 2004; LEMBO et al., 2007; MATTOS-GRANER et al., 2001). Os resultados obtidos no presente estudo são concordantes com os da literatura desde que um total de 75 genótipos diferentes de *S. mutans* foi identificado no G1 e 73 no G2.

Lembo et al. (2007) e Napimoga et al. (2004) relataram um máximo de oito genótipos distintos de *S. mutans* colonizando a cavidade bucal dos pré-escolares. Outros autores (KLEIN et al., 2004; REDMO EMANUELSSON et al., 2003) observaram a presença de até sete genótipos. Resultados semelhantes foram encontrados neste estudo, onde foram evidenciados até oito genótipos distintos no G1 e sete no G2.

A posse de um ou mais clones particulares de *S. mutans* por um indivíduo pode estar relacionada a sua experiência de cárie (BOWDEN, 1997). Segundo Guo

et al. (2006) diferentes tipos clonais de *S. mutans* detectados dentro da cavidade bucal de um indivíduo podem ter propriedades fenotípicas e genéticas diferentes. A detecção de 22 genótipos exclusivos das crianças com assistência odontológica desde o primeiro ano de vida indicam a necessidade de pesquisas futuras visando a caracterização destas linhagens de *S. mutans* quanto aos seus mecanismos e fatores de virulência. Napimoga et al. (2005) afirmam que a identificação de genótipos específicos que podem ser colonizadores mais virulentos pode predizer os locais e indivíduos mais suscetíveis à doença.

Adicionalmente, a presença de 51 genótipos de *S. mutans* exclusivos do G2 sugere uma não seletividade dos microrganismos, conseqüentemente, nesta população não ocorre uma forte pressão seletiva quando comparada ao G1.

Redmo Emanuelsson et al. (2003) sugerem que um número maior de isolados analisados aumentaria a possibilidade de detectar genótipos diferentes. No entanto, Napimoga et al. (2004) não encontraram associação entre o número de isolados de cada voluntário e o número de genótipos detectados. No presente estudo, o número de isolados de *S. mutans* avaliados por criança foi semelhante aos relatados na literatura (ALALUUSUA et al., 1996; MATTOS-GRANER et al., 2001; REDMO EMANUELSSON; LI; BRATTHALL, 1998) e o fato da criança apresentar maior ou menor quantidade de isolados positivos de *S. mutans* não influenciou os achados quanto à diversidade genotípica, significando ser viável em pesquisas de genotipagem avaliar de cinco a dez isolados por indivíduo.

Genótipos de *S. mutans* podem persistir na cavidade bucal das crianças ou serem detectados transitoriamente, refletindo o desenvolvimento contínuo do microbiota bucal infantil (KLEIN et al., 2004). Assim, deve-se ter cautela ao se comparar a diversidade genotípica entre adultos e crianças. Para Lembo et al. (2007) a disparidade etária pode ser responsável pelas diferenças entre os resultados de alguns estudos.

Apesar da semelhança numérica em relação à variedade de genótipos dos *S. mutans* em ambas populações pôde-se observar que essa diversidade, do ponto de vista genético-molecular, influenciou de diferente forma a ocorrência da doença. Portanto, partindo do princípio da existência de uma variabilidade na virulência de

diferentes genótipos de *S. mutans*, categorizamos e associamos a análise da diversidade genotípica com algumas condições e fatores relacionados à cárie dentária.

Um resultado bastante interessante foi encontrado quanto à associação entre a diversidade genotípica dos *S. mutans* e a experiência de cárie nas crianças do G1 onde aquelas que abrigaram um maior número de genótipos apresentaram a doença. Este achado é contrário ao observado por Kreulen et al. (1997) os quais observaram uma correlação negativa entre experiência de cárie e a diversidade genotípica. Entretanto, os resultados apresentados corroboram com relatos prévios (ALALUUSUA et al., 1996; COGULU et al., 2006; GUO et al., 2006; NAPIMOGA et al., 2004; RODRIGUES, 2007; ROSA et al., 2005) de que indivíduos com cárie dentária apresentam mais genótipos do que os livres de cárie.

Vale ressaltar que, assim como observado neste estudo, a literatura também reporta que tanto os indivíduos com cárie dentária quanto aqueles livres da doença podem abrigar mais de um genótipo de *S. mutans* (GUO et al., 2006; ROSA et al., 2005).

Alguns genótipos podem colonizar o hospedeiro e induzir a cárie dentária melhor do que outros (KÖHLER; KRASSE, 1990). Guo et al. (2006) relatam que a alta colonização de *S. mutans* e o crescimento de genótipos múltiplos na mesma cavidade bucal sejam prováveis conseqüências do consumo freqüente de carboidratos fermentáveis. Alaluusua et al. (1996) sugerem que este consumo poderia ter um papel importante na aquisição de determinadas linhagens pelas crianças e que a correlação entre um número elevado de genótipos de *S. mutans* e uma maior prevalência de cárie ocorre, possivelmente, como resultado da atividade simultânea de diversos genótipos com potenciais cariogênicos diferentes. De acordo com Lembo et al. (2007) a maior prevalência de genótipos de *S. mutans* mais resistentes ao desafio ácido em crianças cárie-ativas poderia ajudar a explicar as diferenças na atividade de cárie observada entre as crianças infectadas por estes microrganismos.

Com os resultados obtidos a partir do estudo envolvendo uma amostra populacional diferenciada, pode ser sugerido que as cepas de *S. mutans*, com o

intuito de superar o aumento de resistência do hospedeiro, tenham sofrido constantemente processos de mutações, deleções e troca de informações genéticas gerando novos genótipos mais adaptados às condições bucais impostas pelo programa educativo-preventivo. Li et al. (2001a) acrescentam que a adaptação a um ambiente altamente competitivo por transformação genética não ocorre freqüentemente, porém, quando esta ocorre, pode ser altamente vantajoso para o microrganismo, através da aquisição de um gene de resistência a antibiótico ou um fator de virulência, promovendo grande vantagem seletiva.

A ausência de associação entre o número de genótipos de *S. mutans* e os níveis salivares de EGM assemelha-se aos resultados encontrados por Alaluusua et al. (1996); Lembo et al. (2007) e Mattos-Graner et al. (2001).

O conhecimento de que a cárie dentária é uma doença de caráter multifatorial (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995) e que sua prevenção envolve abordagens sobre os principais fatores predisponentes nos ajuda a tentar entender “por que algumas crianças ainda apresentam experiência da doença, mesmo com assistência odontológica desde o primeiro ano de vida”. Assim sendo, reforçamos a importância das ações educativo-preventivas realizadas no programa e no âmbito domiciliar, principalmente através do controle de hábitos comportamentais como os autocuidados caseiros com a higiene bucal e o consumo de uma dieta não cariogênica. Emilson et al. (1987) demonstraram que cepas isoladas de indivíduos com baixíssima incidência de cárie dentária eram capazes de induzir lesões de cárie avançadas em modelo animal e sugeriram que a baixa prevalência da doença não se deve à ausência de virulência dos *S. mutans*, mas por outros fatores como a dieta.

Walter, Ferelle e Issao (1996) enfatizam que na microbiota reside o ponto crucial da prevenção da cárie dentária através do método etiológico, pois sua eliminação é impraticável, a substituição inviável e sua diminuição questionável, porém a única opção com condições de ser realizada através de métodos parcialmente eficazes, como bochechos de flúor diário, uso de agentes químicos e escovação adequada. Sendo assim, acreditamos que a realização rotineira de procedimentos que visam diminuir a microbiota tenderia a evitar a geração e

acúmulo de genótipos de *S. mutans* mais resistentes, uma vez que no G1 as crianças com uma menor diversidade não desenvolvem a doença.

Os resultados deste estudo sugerem que as ações realizadas no programa educativo-preventivo podem estar contribuindo para o estabelecimento de uma microbiota distinta em uma parcela da população do G1, visto que neste grupo foram encontrados somente 22 isolados específicos.

O delineamento deste estudo foi um fator limitante por utilizar proporções semelhantes entre as diferentes categorias da severidade da cárie, assim como a obtenção de isolados de apenas uma localização na cavidade bucal. Sugerimos como ampliação desta investigação a utilização de amostra da placa dentária formada sobre a lesão cariosa, além da investigação da persistência desses genótipos na cavidade bucal destas crianças. A persistência de uma linhagem bacteriana nesta cavidade estaria associada não somente à sua capacidade de aderência e crescimento, mas também a sua habilidade em sobreviver em condições de estresse, assim como na presença de bactérias competidoras e de substâncias inibitórias.

A presente pesquisa, pioneira na área de biologia molecular a avaliar geneticamente *S. mutans* isolados de crianças com assistência odontológica precoce, enfatiza a necessidade de identificação dos indivíduos com risco à cárie dentária e abre caminho para a realização de novos estudos visando o melhor entendimento do papel da diversidade clonal dos *S. mutans* no desenvolvimento da doença.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e com base na metodologia utilizada pôde-se concluir que:

- 1- Houve associação entre experiência de cárie dentária e diversidade genotípica dos *S. mutans* somente entre os pré-escolares atendidos no programa educativo-preventivo (G1);
- 2- Não houve associação, em ambos os grupos, entre atividade e severidade da cárie dentária e diversidade genotípica dos *S. mutans*;
- 3- Não houve associação, em ambos os grupos, entre índice de higiene oral simplificado e diversidade genotípica dos *S. mutans*;
- 4- Não houve associação, em ambos os grupos, entre o nível salivar de EGM e diversidade genotípica dos *S. mutans*;
- 5- Não houve associação, em ambos os grupos, entre alguns hábitos de higiene bucal/dieta e diversidade genotípica dos *S. mutans*.

REFERÊNCIAS

- AJDIĆ, D. et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA 159, a cariogenic dental pathogen. **Proc Natl Acad Sci**, v.99, n.22, p.14434-14439, Oct. 2002.
- ALALUUSUA, S. et al. Oral colonization by more than one clonal type of *mutans streptococcus* in children with nursing-bottle dental caries. **Arch Oral Biol**, v.41, n.2, p.167-173, Feb. 1996.
- AMOROSO, P. et al. Avaliação comparativa da PCR e fenotipagem na detecção de *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans* e estudo da transmissão. **Cienc Odontol Bras**, v.7, n.2, p.30-40, Abr./Jun. 2004.
- ARDENGHI, T.M. et al. Controle mecânico do biofilme dental. In: CORRÊA, M.S.N.P. **Odontopediatria na primeira infância**. 2.ed. São Paulo: Santos, 2005. p.317-332.
- ARTHUR, R.A. et al. Genotypic diversity of *S. mutans* in dental biofilm formed *In Situ* under sugar stress exposure. **Braz Dent J**, v.18, n.3, p.185-191, 2007.
- AUTARQUIA DO SERVIÇO MUNICIPAL DE SAÚDE DE LONDRINA. **Levantamento epidemiológico de cárie dentária em escolares de 5 e 12 anos e fluorose na idade de 12 anos, da rede pública e particular de ensino, zona urbana e rural dos municípios de Londrina, Cambé e Ibiporã**. Londrina, 2004.
- BEBÊ CLÍNICA - UEL. Disponível em: < <http://www.bebeclinica.uel.br> >. Acesso em: 20 set. 2008.
- BOWDEN, G.H. Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 25, n.1, p.76-81, Feb. 1997.
- BRATTHALL, D. Caries, views and perspectives. **Scand J Dent Res**, v. 100, p.47-51, Feb. 1992.
- CAUFIELD, P.W; WALKER, T.M. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphisms. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 2, p.274-278, Feb. 1989.
- COGULU, D. et al. Genotyping of *Streptococcus mutans* by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down Syndrome. **Arch Oral Biol**, v.51, n.3, p.177-182, Mar. 2006.
- CONSELHO REGIONAL DE ODONTOLOGIA DO PARANÁ. **Guia de orientação - saúde bucal nos primeiros anos de vida**. Curitiba, 2008.
- DE LORENZO, J.L. **Microbiologia para o estudante de odontologia**. São Paulo: Ateneu, 2004.

- EMILSON, C.G.; CARLSSON, P.; BRATTHALL, D. Strains of *mutans streptococci* isolated in a population with extremely low caries prevalence are cariogenic in the hamster model. **Oral Microbiol Immunol**, v.2, n.4, p.183-186, Dec.1987.
- FRAIZ, F.C. Dieta e cárie na primeira infância. In: WALTER, L.R.F.; FERELLE, A.; ISSAO, M. **Odontologia para o bebê**. São Paulo: Artes Médicas, 1996. p.109-122.
- GOLD, O.D.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol**, v. 18, n. 4, p.1357-1364, Nov. 1973.
- GOODMAN, Steven; GAO, Qian. Characterization of the *gtfB* and *gtfC* Promoters from *Streptococcus mutans* GS-5. **Plasmid**, v.43, n.1, p.85–98, Jan. 2000.
- GREENE, J.C.; VERMELLION, J.R. The simplified oral hygiene index. **J Am Dent Assoc**, v.68, n.1, p.25-31, Jan. 1964.
- GRÖNROOS, L.; ALALUUSUA, S. Site-specific oral colonization of *mutans streptococci* detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. **Caries Res**, v.34, n.6, p.474-480, Nov./Dec.2000.
- GUO, L.H. et al. Identification of genetic differences between two clinical isolates of *Streptococcus mutans* by suppression subtractive hybridization. **Oral Microbiol Immunol**, v.21, n.6, p.372-380, Dec. 2006.
- GUO, L.H. et al. Identification of protein differences between two clinical isolates of *Streptococcus mutans* by proteomic analysis. **Oral Microbiol Immunol**, v.23, p.105-111, Apr. 2008.
- HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev**, v.44, n.2 , p.331-384, Jun. 1980.
- HAMES-KOCABAS, E.E. et al. Colonization and vertical transmission of *Streptococcus mutans* in Turkish children. **Microbiol Res**, v.163, n.2, p.168-172, Mar. 2008.
- KAMIYA, R.U. et al. Frequency of four different mutacin genes in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-free and caries-active individuals. **J Med Microbiol**, v.54, n.5, p.599-604. May. 2005.
- KLEIN, M.I. et al. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. **J Clin Microbiol**, v. 42, n.10, p.4620–4626, Oct. 2004.
- KÖHLER, B.; BRATTHALL, D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. **J Clin Microbiol**, v.9, n.5, p.584-588, May. 1979.
- KÖHLER, B.; KRASSE, B. Human strains of *mutans streptococci* show different cariogenic potential in the hamster model. **Oral Microbiol Immunol**, v.5, n.4, p.177-180, Aug. 1990.

KRAMER, P.F.; FELDENS, C.A.; ROMANO, A.R. **Promoção de saúde bucal em odontopediatria** - diagnóstico, prevenção e tratamento de cárie oclusal. São Paulo: Artes Médicas, 1997.

KREULEN, C.M. et al. *Streptococcus mutans* in children using nursing bottles. **ASDC J Dent Child**, v. 64, n.2, p.107-111, Mar./Apr. 1997.

LEMBO, F.L. et al. Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children. **Oral Microbiol Immunol**, v.22, n.5, p.313–319, Oct. 2007.

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, n.1, p.17-22, Feb. 1998.

LI, Y., et al. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. **J Bacteriol**, v.183 n.3, p.897-908, Feb. 2001a.

LI, Y., et al. Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. **Oral Microbiol Immunol**, v.16, n.1, p.16-23, May. 2001b.

LIU, Y. et al. Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* in 3- to 4-year-old Chinese nursery children suggests horizontal transmission. **Arch Oral Biol**, v.52, n.9, p.876-881, Sep. 2007.

LÖESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol Rev**, v.50, n.4, p.353-380, Dec. 1986.

LONGO, P.L.; MATTOS-GRANER, R.O.; MAYER, M. P. Determination of mutacin activity and detection of mutA genes in *Streptococcus mutans* genotypes from caries-free and caries-active children. **Oral Microbiol Immunol**, v.18, n.3, p.144-149, Jun. 2003.

MALTZ, M.; PAROLO, C.F.; JOBIM, J.J. Cariologia Clínica. In: TOLEDO, O.A. **Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica**. 3.ed. São Paulo: Premier, 2005. p.105-152.

MATEE, M.I.N. et al. *Mutans streptococci* in caries-active and caries-free infants in Tanzania. **Oral Microbiol Immunol**, v. 8, n. 5, p.322-324, Oct. 1993.

MATTOS-GRANER, R.O. et al. Water-insoluble glucan synthesis by *mutans streptococcal* strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. **J Dent Res**, v.79, n.6, p.1371-1377, Jun. 2000.

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

MATTOS-GRANER, R.O. et al. Comparative analysis of Gtf isozyme production and diversity in isolates of *Streptococcus mutans* with different biofilm growth phenotypes. **J Clin Microbiol**, v. 42, n.10, p.4586-4592, Oct. 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Projeto SB Brasil: Condições de saúde população brasileira** - Resultados Principais. Brasília, 2004.

MOTEGI, M. et al. Assessment of Genes Associated with *Streptococcus mutans* Biofilm Morphology. **Appl Environ Microbiol**, v.72, n.9, p.6277-6287, Sep.2006.

NAPIMOGA, M.H. et al. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. **J Med Microbiol**, v.53, part.7, p.697-703, July. 2004.

NAPIMOGA, M.H. et al. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. **J Oral Sci**, v.47, n2, p.59-64, Jun. 2005.

NASCIMENTO, M.M.; HÖFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B. *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. **Caries Res**, v.38, n.5, p.454-463, Sep./Oct. 2004.

NÖR, J.E. Genética e biologia molecular na promoção de saúde. In: TOLEDO, O.A. **Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica**. 3.ed. São Paulo: Premier, 2005. p.153-162.

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

OKADA, M. et al. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. **J Med Microbiol**, v. 51, n.5, p.443-447, May. 2002.

PETERSEN, PE. The World Oral Health Report 2003: Continuous improvement of oral health in the 21st century - the approach of the WHO Global Oral Health Programme. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.31, suppl. 1, p.3-24, Dec. 2003.

PINTO, L. M. C. **Fatores associados com a experiência de cárie em crianças de 4 e de 6 anos de idade atendidas em um programa educativo-preventivo**. 2003. 139 f. Tese (Doutorado em Odontopediatria) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2003.

RAMALINGAM, L.; MESSER L.B. Early childhood caries: an update. **Singapore Dent J**. v.16, n.1, p.21-9, Dec. 2004.

REDMO EMANUELSSON, I.M.; LI, Y; BRATTHALL, D. Genotyping shows different strains of *mutans streptococci* between father and child and within parental pairs in Swedish families. **Oral Microbiol Immunol**, v.13, n.5, p271-277, Oct. 1998.

REDMO EMANUELSSON, I.M.; WANG, X. Demonstration of identical strains of *mutans streptococci* within Chinese families by genotyping. **Eur J Oral Sci**, v.106, n.3, p.788-794, Mar. 1998.

REDMO EMANUELSSON, I.M. et al. Tracing genotypes of *mutans streptococci* on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Oral Microbiol Immunol**, v.18, n.1, p24-29, Feb. 2003.

RODRIGUES, M.R. **Avaliação da diversidade genotípica, sorotipos e mutacinas em *Streptococcus mutans* isolados de pré-escolares com diferentes experiências de cárie.** 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2007.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system,** version 2.1. Exeter Software: Setauket, NY, 2000.

ROSA, R.T. et al. Clonal diversity of *Streptococcus mutans* Clarke (1924) in caries-free adults. **Estud Biolog**, v.27, n.58, p.49-51, Jan./Mar. 2005.

ROSA, R.T. et al. Clonal characterization of *Streptococcus mutans*. Strains by multilocus enzyme electrophoresis. **Braz J Microbiol**, v.37, n.1, p.17-19, Jan./Mar. 2006.

SAARELA, M. et al. Genetic diversity within isolates of mutans streptococci recognized by an rRNA gene probe. **J Clin Microbiol**, v.31, n.3, p.584-587, Mar. 1993.

SAARELA, M. et al. Typing of *mutans streptococci* by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Arch Oral Biol**, v.41, n.8/9, p.821-826, Aug./Sep.1996.

SEKI, M. et al. Effect of mixed *mutans streptococci* colonization on caries development. **Oral Microbiol Immunol**, v.21, n.1, p.47-52, Feb. 2006.

SHEMESH, M. et al. Differential expression profiles of *Streptococcus mutans* *ftf*, *gtf* and *vicR* genes in the presence of dietary carbohydrates at early and late exponential growth phases. **Carbohydr Res**, v. 341, n.12, p.2090-2097, Sep. 2006.

SPOLIDORIO, D.M.P.et al. Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in Brazilian family members. **Braz J Microbiol**, v.34, n.3, p.213-217, July./Sep. 2003.

THENISCH, N.L. et al. Are mutans streptococci detected in preschool children a reliable predictive factor for dental caries risk? A systematic review. **Caries Res**, v. 40, n.5, p.366-374, Aug. 2006.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica.** 2. ed. São Paulo: Santos, 1995.

WALTER, L.R.F; FERELLE, A.; ISSAO, M. **Odontologia para o bebê.** São Paulo: Artes Médicas, 1996.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Oral health surveys, basic methods.** 4. ed. Geneva, 1997.

YAMASHITA, Y. et al. Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. **Infect Immun**, v.61, n.9, p.3811-3817, Sep.1993.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Carta de Esclarecimento aos Pais e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



Universidade Norte do Paraná
Mestrado em Odontologia

Avaliação da diversidade genotípica de *Streptococcus mutans* em pré-escolares atendidos em um programa educativo-preventivo

Carta de Esclarecimento aos Pais

Prezado (a) pai ou responsável:

Este projeto de pesquisa pretende avaliar a diversidade genotípica do principal microorganismo associado ao aparecimento da cárie dentária (*Streptococcus mutans*) e relacioná-la com a experiência de cárie em pré-escolares de 5 anos de idade.

Será realizada uma entrevista com vocês sobre a condição de saúde de seu filho (a) bem como um exame clínico para verificar a presença de cárie e uma evidenciação da placa bacteriana para avaliar a higiene bucal. Também será colhida uma amostra de saliva da superfície da língua de seu filho (a). Todos esses procedimentos são simples, rápidos e indolores à criança, não existem riscos ou desconforto associados à criança ou à família, e os procedimentos realizados serão gratuitos.

A participação da criança neste projeto será determinada pelo seu responsável, cabendo-lhe direito de desistência, se assim o quiser.

Os pesquisadores asseguram que todos os dados coletados serão mantidos em sigilo e comprometem-se a fornecer aos entrevistados todas as informações obtidas durante o estudo, bem como orientações sobre cuidados com a saúde bucal. Os dados obtidos serão utilizados para fazer uma pesquisa científica, incluindo posterior publicação dos resultados em dissertações, teses, revistas e livros especializados.

Maiores esclarecimentos podem ser obtidos com a Profª Drª Cássia Cilene Dezan Garbelini na clínica Odontológica da Universidade Norte do Paraná ou pelo telefone 3371-7768 e com a mestranda Ana Lídia Soares Cota pelo telefone 9915-3544.



Universidade Norte do Paraná
Mestrado em Odontologia

Nº:

Avaliação da diversidade genotípica de *Streptococcus mutans* em pré-escolares atendidos em um programa educativo-preventivo

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Foi-me explicado que a referida pesquisa não implicará em danos à saúde de meu (minha) filho (a) e, sendo só para o momento, ratifico a autorização.

Eu,, documento de identidade nº, responsável pelo (a) menor, estou consciente do acima exposto e concordo plenamente com a sua participação nesta pesquisa.

Londrina, de de 2007.

.....
Assinatura do Responsável

.....
Assinatura do Pesquisador Responsável

APÊNDICE B - Questionário.



Universidade Norte do Paraná
Mestrado em Odontologia

Avaliação da diversidade genotípica de *Streptococcus mutans* em pré-escolares atendidos em um programa educativo-preventivo

Questionário

Formulário nº: _____
Grupo: _____
Data: ___/___/___
Entrevistador: _____

I – DADOS PESSOAIS

Nome completo da criança: _____
Sexo - 1. () M. 2. () F. Data de Nascimento _____ Idade _____ anos.
Endereço: _____
Telefone p/ contato _____
Telefone de um parente para contato _____
Nome da mãe: _____ Idade: _____ anos
Nome do pai: _____ Idade: _____ anos

Nome do parente	Relação com o paciente	Idade	Escolaridade	Profissão	Salário Mensal

Quem cuida da criança durante o dia?

1. () mãe 4. () babá
2. () pai 5. () professora da creche/escola
3. () avó 6. () outros: _____

II - SAÚDE GERAL

Seu filho(a) está bem de saúde? () 1. Não. () 2. Sim.

Seu filho(a) está sob tratamento médico? () 1. Não. () 2. Sim.
Se sim, qual o motivo e a medicação utilizada? _____

III – SAÚDE BUCAL

Seu filho(a) já foi ao dentista? () 1. Não. () 2. Sim.

Qual a idade da primeira consulta?

- () 1. No primeiro ano de vida
() 2. No período de 12 a 24 meses
() 3. No período de 24 a 36 meses
() 4. No período superior a 36 meses

Quando você iniciou a limpeza dos dentes de seu filho(a)?

- () 1. Ainda não iniciou.
 () 2. Antes de a criança ter dentes
 () 3. Quando nasceram os primeiros dentes
 () 4. Depois que nasceram todos os dentes
 () 5. Outros. Especificar: _____

De que forma você iniciou a limpeza dos dentes de seu filho(a)?

- () 1. Com escova e pasta
 () 2. Com escova sem pasta
 () 3. Com escova, pasta e fio dental
 () 4. Fralda ou pano úmido() 5. Algodão/cotonete/gaze
 () 6. Outros. Especificar: _____

Atualmente, quantas vezes por dia seu filho(a) limpa os dentes?

- () 1. Não limpa.
 () 2. Uma vez.
 () 3. Duas vezes.
 () 4. Três vezes.
 () 5. Outros. Especificar: _____

Como você atua quanto a escovação de seu filho(a)?

- () 1. Deixa que escove sozinho(a).
 () 2. Complementa algumas vezes a limpeza feita por ele(a) (Ajuda na escovação)
 () 3. Apenas supervisiona a limpeza efetuada por ele(a).
 () 4. Outro. Especificar: _____

Seu filho(a) utiliza o fio dental? () 1. Não () 2. Sim

Qual é a água que seu filho(a) ingere?

- () 1. Abastecimento público
 () 2. Poço artesiano
 () 3. Água mineral

Seu filho(a) utiliza dentifrício nas escovações? () 1. Não () 2. Sim

Quando ele(a) começou a usar o dentifrício?

- () 1. Quando nasceram os primeiros dentes
 () 2. Quando nasceram os molares
 () 3. Após os 3 anos de idade

Qual é o tipo de dentifrício utilizado?

- () 1. Sem flúor
 () 2. Baixa concentração de flúor (Colgate Baby- Barney)
 () 3. Concentração de flúor superior a 1.000 ppm (Pastas de adulto, Tandy, Colgate Bob Esponja, Barbie...)

ANEXO

ANEXO - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNOPAR.



Universidade Norte do Paraná

Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO

PROTOCOLO: PP 281/07

RESPONSÁVEL: *Cássia Cilene Dezan Garbelini*

O Comitê de Ética em Pesquisa da Unopar analisou e APROVOU quanto ao aspecto ético o projeto **"Avaliação da diversidade genotípica de *Streptococcus mutans* em pré-escolares atendidos em um programa educativo-preventivo"**.

O CEP/UNOPAR estabelece:

- a) O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- b) O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP/UNOPAR (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- c) O CEP/UNOPAR deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alteram o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP/UNOPAR junto com seu posicionamento.
- d) Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP/UNOPAR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- e) Semestralmente devem ser encaminhados relatórios parciais e ao término do projeto o relatório final. *

Londrina, 21 de novembro de 2007

Prof. Dr. Hélio Hiroshi Sugimoto
Presidente do C.E.P. UNOPAR

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)