

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ

JOSÉ JOÃO MARIANO LIMA

**Presença do fator de virulência Mutacina IV
em cepas de *Streptococcus mutans***

TAUBATÉ – SP

2019

JOSÉ JOÃO MARIANO LIMA

**Presença do fator de virulência Mutacina IV
em cepas de *Streptococcus mutans***

Trabalho de Graduação apresentado para
obtenção do Título de Bacharel pelo Curso de
Ciências Biológicas do Departamento de
Biologia da Universidade de Taubaté
Área de concentração: Ciências Biológicas
bacharelado

Orientador: Prof.Dr^a. Maria Cristina Prado
Vasques Cunha

Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBi/UNITAU
Biblioteca Setorial de Biociências

L732p Lima, José João Mariano
Presença do fator de virulência mutacina IV em cepas de
Streptococcus mutans / José João Mariano Lima. – 2019.
37 f. : il.

Monografia (Graduação) – Universidade de Taubaté,
Departamento de Ciências Biológicas, 2019.

Orientador: Profa. Dra. Maria Cristina Prado Vasques,
Departamento de Ciências Biológicas.

1. *Streptococcus mutans*. 2. Cárie. 3. Fator de virulência.
4. Mutacina. I. Título.

CDD- 579.355

JOSÉ JOÃO MARIANO LIMA

Presença do fator de virulência Mutacina IV em cepas de *Streptococcus mutans*

Trabalho de Graduação
apresentado para obtenção do
Título de Bacharel
pelo Curso de Ciências Biológicas
do Departamento de Biologia
da Universidade de Taubaté
Área de concentração: Ciências
Biológicas Bacharelado.

DATA:

BANCA EXAMINADORA:

Membros/Instituição

Prof. Dr: _____/Universidade de Taubaté

Prof.Dr: _____/_____

Prof. Dr: _____/_____

Orientador:

Prof. Dr: _____/_____

Assinatura: _____

Dedico esse trabalho a minha mãe,
que sempre esteve aqui por mim,
seja em carne ou em espírito.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, que sempre esteve lá e sempre incentivou para que eu chegasse até aqui. Saiba que isso é para você.

À minha família por todo o apoio e amor.

À Prof.^a Dra. Maria Cristina, por ter me orientado e me ajudado durante todo o percurso desse trabalho. Não poderia ter escolhido melhor pessoa. Nunca vou esquecer.

À Prof.^a Ma. Juliana Santos, que nos auxiliou durante todo o processo do trabalho, nos guiando e compartilhando parte do seu conhecimento.

À Universidade de Taubaté por ter fornecido as instalações necessárias para o desenvolvimento desse projeto.

Aos meus amigos, que me apoiaram e me ajudaram durante todo esse trajeto.

A mim. Obrigado por não ter desistido.

Não há oceano no mundo
maior do que a imensidão do
seu ser, mergulhe nele e
orgulhe-se.

— *Pai Joaquim de Aruanda.*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da OMS para valores CPO-D médio em uma população, considerando 12 anos de idade	12
Tabela 2 – Primers utilizados no presente estudo	13
Tabela 3 – Tabela representativa das análises realizadas dividida por região, amostras que apontaram presença de mutacina IV de Streptococcus mutans e o índice CPO-D da região	15

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do município de Taubaté, representativo das regiões analisadas

11

RESUMO

A bactéria *Streptococcus mutans* se mostra como pioneira em processos cariogênicos, sendo que uma das causas da sua prevalência e sucesso de estabilização no biofilme dentário é a presença dos fatores de virulência, dentre eles a Mutacina IV. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a presença de do gene Mutacina IV em cepas clínicas de *Streptococcus mutans* em escolares de 12 anos no município de Taubaté, São Paulo. Os resultados mostraram uma maior incidência do gene da Mutacina IV nas cepas de *Streptococcus mutans* das amostras coletadas na região Norte (57%), e a população que apresentou a menor porcentagem de presença deste fator de virulência foi a da região Oeste (5%). Com base nos resultados obtidos não foi possível demonstrar uma relação entre a presença do gene da Mutacina IV em cepas de *S. mutans* e o índice de CPO-D da população estudada. Conclui-se que não foi possível estabelecer relação entre a presença do gene de Mutacina IV nas cepas de *S. mutans* e a incidência de cárie na população estudada.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*. Cárie. Fator de virulência. Mutacina.

ABSTRACT

A bacterium *Streptococcus mutans* shows itself as a pioneer in cariogenic processes, and one of the causes of its prevalence and success of stabilization in the dental biofilm is the presence of virulence factors of these IV mutacins. The aim of the present study was to evaluate the presence of the Mutacin IV gene in clinical *Streptococcus mutans* strains in 12-year-old schoolchildren from Taubaté, Sao Paulo. The results show a higher incidence of the Mutacin IV gene in *S. mutans* strains of samples collected in the Northern region (57%), and in the population that exhibits the lowest percentage of presence of this virulence factor in the Western region (5%). Based on the results obtained, it was not possible to demonstrate a relation between the presence of the Mutacin IV gene in *S. mutans* strains and the DMFT index of the studied population. It was concluded that it was not possible to establish a relation between the presence of the Mutacin IV gene in *S. mutans* strains and the incidence of caries in the studied population.

Keywords: *Streptococcus mutans*. Caries. Virulence. Mutacin.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4. RESULTADOS.....	14
5. DISCUSSÃO	16
6. CONCLUSÃO.....	19

1. INTRODUÇÃO

Segundo o relatório da OMS (Organização Mundial da Saúde) de 2003, a cárie dentária afeta de 60% a 90% das crianças e adultos em idade escolar, o que a torna uma das doenças mais comuns em todo o mundo (BRASIL, 2012). É uma doença multifatorial e *Streptococcus mutans* é considerado o principal agente etiológico (FONTANA, 2015; BANAS, 2003; VICKERMAN, 2003; OPPENHEIM *et al*, 2007; NOBBS *et al*, 2009). O sucesso e estabelecimento de *S. mutans* depende de muitos fatores, os quais incluem fatores de virulência das cepas, microbiota competitiva, dieta, constituição genética, comportamento e imunidade do hospedeiro (BOWDEN, 1998; HAMILTON, 1998).

A patogenicidade de *S. mutans* está diretamente relacionada ao seu metabolismo e sua capacidade de produzir grandes quantidades de ácidos orgânicos (acidogenicidade) e de tolerar o ambiente ácido (aciduridade) e isso pode tornar essa espécie significativamente mais numerosa no biofilme cariogênico (BOWEN, 2011; KOO, 2011) bem como a produção de mutacinas, que são proteínas antibacterianas (bacteriocinas) capazes de inibir o crescimento de outras bactérias Gram positivas genética e ecologicamente relacionadas.(CAUFIELD *et al*, 1993; QI, 2001; CAUFIELD, 2001)

Em se tratando do acompanhamento da saúde bucal, a verificação de dentes cariados, perdidos e obturados (Índice CPO-D) ainda é um método que, pela abrangência, é o mais aceito e recomendado pela OMS para diferentes faixas etárias e, em especial, para crianças com idade escolar (WHO, 1997).

Com base nos valores do índice CPO-D na idade de 12 anos, foi observado que a prevalência de cárie entre escolares no período de 1968 – 1996 decaiu no Brasil. Entre 1980 e 1996 a redução nos valores do índice CPO-D aos 12 anos foi da ordem de 57,8% (NARVAI, 2000).

O mais recente levantamento epidemiológico de saúde bucal promovido pelo Ministério da Saúde confirmou essa tendência de declínio de cárie nos escolares brasileiros (BRASIL, 2012). Entretanto, pouco se conhece sobre a relação entre esses índices nos municípios brasileiros, já que os dados publicados pelo Ministério da

Saúde demonstram um panorama geral e não uma identidade de cada município. Ainda são poucos os estudos brasileiros sobre saúde bucal, no que se refere a prevalência de cárie, quando comparados a países desenvolvidos e ainda mais raros os estudos realizados por município.

De acordo com acima exposto, o objetivo desse trabalho é analisar a presença de mutacina IV em cepas de *Streptococcus mutans* coletadas de escolares de 12 anos matriculados nas escolas urbanas da rede municipal de ensino de Taubaté-SP e relacionar a presença desses fatores de virulência com a presença de cáries.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A cárie dentária se mostra como um dos problemas mais prevalentes em relação a saúde bucal humana, sendo sua ocorrência diversamente ampla e os custos relacionados a ela altos (KEYES, 1960; CAULFIELD *et al*, 1993; CAULFIELD, 1997; LISTL *et al*, 2015; MANJI *et al*, 2018). O processo carioso tem uma origem multifatorial, sendo ela configurada pela desmineralização de tecidos previamente mineralizados que compõe o corpo dental, podendo ser provocado pelo desequilíbrio da microbiota bucal. Esse desequilíbrio pode ocorrer pela presença frequente de carboidratos fermentáveis (BOWDEN, 1998; HAMILTON, 1998; MARSH, 1999; TAKAHASHI, 2011; NYVAD, 2011; FAUSTOVA *et al*, 2018) e potencializado em hospedeiros cujo os fatores que favorecem a reorganização (BUISCHI, 1997; AXELSSON, 1997; GRIGALUSKIEN *et al*, 2015) ou neutralização (SEOW, 1998) do biofilme dentário cariogênico não apresente sua ação eficientemente.

Para estudos relacionados com a saúde bucal a saliva apresenta-se como um material de diagnóstico fácil de coletar, transportar e armazenar (KUBALA *et al.*, 2018), além de não ser invasivo ao indivíduo. A saliva constitui um fator de extrema importância para a manutenção da homeostase na boca (devido ao conteúdo de componentes orgânicos e inorgânicos) (KUBALA *et al*, 2018). Também é responsável pela proteção da superfície das membranas mucosas contra fatores biológicos, mecânicos e químicos (MARTÍNEZ-PABÓN, 2013; MORALES-UCHIMA, 2013; MARTÍNEZ-DELGADO, 2013). A composição da saliva se caracteriza por 99,5% de água, 0,3% de proteína e 0,2% de substâncias inorgânicas e orgânicas.

Os constituintes inorgânicos mais comuns são sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloretos e carbonatos, enquanto os componentes orgânicos incluem amilases, peroxidases, lipases, mucinas, lisozima, lactoferrina, calicreínas, cistatinas e hormônios (DODDS *et al*, 2005). A saliva também apresenta capacidade tamponante, ou seja, se houver acidificação ligeira no ambiente, a saliva torna-se uma solução insaturada e formam-se hidrogenofosfatos de cálcio facilmente solúveis, permitindo a diminuição da suscetibilidade dos dentes à cárie e quando o pH dessa secreção está entre 6,8 e 7,2, ela se torna uma solução saturada de fosfato de cálcio, o que resulta em remineralização rápida e eficaz do esmalte dentário, provendo um

maior sucesso na proteção da saúde bucal como um todo. (DODDS *et al*, 2005; BRETAS *et al*, 2008).

Entre os componentes orgânicos que fazem parte da saliva, é importante destacara presença de muitas espécies de microrganismos como bactérias e fungos. Esses microrganismos formam o denominado microbiota bucal, estabelecendo relações ecológicas complexas e integras entre si. A microbiota bucal pode ser repartida em quatro nichos principais, representados pelo biofilme dentário, sulco gengival, dorso da língua e mucosa da boca (JORGE, 2012; GRIGALUSKIENĖ *et al*, 2015).

Uma etapa importante na colonização bacteriana e no estabelecimento de muitos quadros infecciosos perante a estabilização da colônia bacteriana, relacionada a uma maior proteção contra o sistema imune e contra agentes antimicrobianos, é a formação de biofilme (DONLAN, 2002; COSTERTON, 2002; DAVIES., 2003), que pode ser definido como um aglomerado microbiano imerso em uma matriz de polissacarídeos extracelulares, que confere aderência e fornece meios susceptíveis a multiplicação e desenvolvimento de microrganismos sobre a superfície dos dentes, na presença de um substrato (CVITKOVITCH *et al*, 2003; LOPEZ *et al*, 2010).

Acredita-se que essa matriz formada por polissacarídeos, na qual o biofilme fica imerso torna mais fácil a formação de microambientes mais ácidos que favorecem a sobrevivência de bactérias acidúricas e acidogênicas como *Streptococcus mutans*, *Actinomyces* e lactobacilos, e que por meiodeste ambiente, ocorra a modulação da atividade microbiana, virulência e a patogênese da cárie dental (ALALUUSUA *et al*, 1996; KAMIYA *et al*, 2005; KOO *et al*, 2013; KLEIN *et al.*, 2015).

As espécies *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* secretam diversas proteínas extracelulares que podem estar relacionadas na colonização de superfícies orais, sendo importantes na segunda fase do desenvolvimento do biofilme dental e em atividades metabólicas que levam à iniciação da lesão de cárie dentária (HAMADA., 1980; SLADE, 1980; LOESCHE, 1985).

As superfícies da cavidade oral são frequentemente colonizadas por microrganismos, sendo que os organismos do gênero *Streptococcus* constituem parte essencial dessa microbiota (HOFLIN *et al*, 2002), sendo o *Streptococcus mutans* um

agente etiológico frequentemente relacionado em processos cariogênicos, sendo apresentado como o principal.

O grupo *mutans* apresenta espécies antigênicas e geneticamente heterogêneas, originando assim, várias linhagens desses microrganismos, as quais permitiram o conhecimento de diferentes biotipos (HOFLIN *et al*, 2002). Seu sucesso de estabelecimento nos dentes do hospedeiro é dependente de diversos fatores, incluindo os fatores de virulência das cepas, microbiota competitiva, dieta, constituição genética, comportamento e imunidade do hospedeiro (BONELLI, 2006; SCHNEIDER, 2006)

A patogenicidade de *Streptococcus mutans* está altamente associada com sua enorme capacidade de produzir ácidos orgânicos (acidogenicidade) em grande escala, e de tolerar ambientes ácidos (aciduridade), favorecendo sua incidência alta no biofilme cariogênico (BOWEN, 2011; KOO *et al*, 2011), levando em consideração que, nas superfícies dos dentes não ocorre nenhuma renovação epitelial, o que contribui para que esses microrganismos possam colonizar e crescer nessas regiões, além de causar a desmineralização do esmalte dentário (HEILMANN, *et al.*, 2015).

Por meio do processo conhecido como *quórum sensing* acontece um crescimento na geração, liberação e detecção de moléculas sinalizadoras auto indutoras. Por conta do aumento da densidade bacteriana, as moléculas auto indutoras podem tender a se acumular e estimular a transcrição de genes específicos que agem na regulação de várias funções como motilidade, virulência, e até na própria produção de matriz exopolissacarídica (EPS) (HOIBY *et al*, 2011).

Destaca-se que estudos sobre a biodiversidade de espécies cariogênicas são promissores, visto que diferentes genótipos em um mesmo indivíduo podem variar na expressão das características patogênicas (CAUFIELD *et al*, 1993; LIU *et al*, 2013). Porém, pouco se conhece sobre a extensão da variação genômica do *S. mutans* ou sobre o mecanismo que gera essa diversidade (OLD *et al*, 2006).

As bacteriocinas pertencem a família de peptídeos produzidos pelos ribossomos, caracterizando-se como proteínas produzidas pelas bactérias para inibir o crescimento de cepas fortemente relacionadas. A produção dessas substâncias visa modular o crescimento de microrganismos competidores ocupando o mesmo nicho ecológico (HALE *et al*, 2005). Sendo assim, o *Streptococcus mutans* também se

destaca pela presença de bacteriocinas denominadas mutacinas, sendo um dos principais fatores de virulência (MERRITT, 2012; QI, 2012.). As mutacinas são proteínas antibacterianas caracterizadas por serem capazes de inibir o crescimento de outras bactérias Gram positivas genética e ecologicamente relacionadas. (GRONROOS *et al*, 1998).

De acordo com as características de suas propriedades biológicas como o de antagonismo seletivo, as mutacinas desempenham papel preponderante no processo de colonização e consolidação de uma cepa pioneira e cepas com alta produção dessas substâncias são mais facilmente transmitidas de um adulto para uma criança comparada com outras cepas com baixa atividade mutacinolítica (GRONROOS *et al*, 1998).

As mutacinas são caracterizadas e classificadas, de acordo sua estrutura química, atividade bactericida e sensibilidade para outras mutacinas e pela própria produzida, em dois grupos: as lantibióticas (contendo resíduos de lantioninas e/ou β -metiltionina), formam esse grupo as mutacinas I, II e III; e as não-lantibióticas, grupo esse caracterizado pela presença das mutacinas IV e V (BOWEN, 2011; KOO, *et al*, 2011; CAUFIELD *et al*, 1993), sendo os genes das mutacinas I, II, III e IV já sequenciados. (QI, 2000; CHEN *et al*, 2000.).

A presença de mutacinas se mostra de extrema importância sob o biofilme formado na superfície dentária, onde a partir desses compostos, se permite uma maior estabilização de *S. mutans* mutacina produtores na cavidade oral (KURAMITSU *et al*, 2007; KAMIYA *et al*, 2005; 2011).

Os lantibióticos geralmente exercem sua atividade antimicrobiana apenas contra as espécies Gram-positivas, perturbando a integridade da membrana citoplasmática por meio da formação transitória de poros, que é, em alguns casos, facilitada pela ancoragem ao lipídio precursor do peptidoglicano II, inibindo a biossíntese da parede celular (H'ÉCHARD, 2002; SAHL, 2002; TWOMEY *et al*, 2002; CHATTERJEE *et al*, 2005; PATTON, 2005; VAN DER DONK, 2005; BONELLI *et al*, 2006; Breukink, 2006; KRUIJFF, 2006)

A mutacina I possui o mais amplo espectro de atividade (CAULFIELD *et al*, 1985; KRETH *et al*, 2005; NGUYEN *et al*, 2009) e sua produção é rigorosamente controlada por vias regulatórias complexas codificadas por 25 genes (TSANG *et al*,

2005). Essa proteína é termoestável e biologicamente ativa sob um amplo espectro de pH (4 a 10) (NOVAK *et al*, 1994; QI *et al*, 2001; TSANG *et al*, 2005).

A mutacina II influencia o nível energético da célula por conta da inibição do desempenho de enzimas essenciais na produção de energia metabólica. Esta incluído no seu mecanismo de ação a despolarização transitória do potencial elétrico e do gradiente de pH transmembrana, bem como o esgotamento do estoque intracelular de ATP, levando a morte bacteriana sem a visualização de lise (CHIKINDAS, 1995; DUFOUR *et al*, 2007).

A mutacina III é ativa especialmente contra patógenos resistentes a medicamentos, entre eles *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina e *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina. Essa mutacina, junto com as mutacinas I e II fazem parte da classe dos lantibióticos e apresentam potencial para serem utilizadas em terapias antibióticas devido ao seu amplo espectro de ação contra bactérias Gram positivas (PARROT *et al*, 1990, KAMIYA *et al*, 2005).

A mutacina IV inibe o crescimento dos colonizadores primários da superfície dentária (*Streptococcus* bucais do grupo *mitis*) podendo, assim, favorecer a instalação do *Streptococcus mutans* (QI *et al*, 2001; HALE *et al*, 2005; KAMYIA *et al*, 2005; KRETH *et al*, 2005; LIU *et al*, 2013). Acredita-se que a capacidade de adsorção das moléculas da mutacina IV à superfície da bactéria, por meio de receptores específicos, configura como o fator responsável pelo seu reduzido espectro de ação em relação as outras mutacinas (MERRIT, 2012; QI., 2012).

A mutacina V possui atividade antimicrobiana mais ampla, agindo principalmente em *Streptococcus mitis*, *Lactococcus* e *Micrococcus* (GALVÃO *et al*., 2017).

Em estudo que se avaliou o papel dos peptídeos NImA e NImB que compõem a mutacina IV das cepas de *S. mutans* UA159, destacou-se que seu espectro antimicrobiano é mais amplo do que anteriormente foi caracterizado. Em testes contra 18 indicadores de cepas que não se mostram sensíveis a mutacina IV, foi observado uma diminuição da atividade inibitória contra todas as cepas, porém três cepas apresentaram um gene para uma mutacina nova, sendo sugerido por parte dos

autores, em dar seqüência a nomenclatura, nomeando-a mutacina V (HALE *et al*, 2005).

Em estudos de Kamiya *et al*. (2005) foram avaliados a relação entre a diversidade genética e a produção de mutacina em indivíduos que apresentavam cárie e indivíduos livres de cárie. Os autores demonstraram por meio de seus resultados relevante variação na produção de mutacina também no espectro de inibição em ambos os grupos, levantando-se a possibilidade de haver uma associação entre a atividade mutacínica e diferentes padrões de colonização de *S. mutans* em ambos os grupos. Foi também possível observar que linhagens referentes ao mesmo genótipo de *S. mutans* apresentaram diferentes perfis de mutacina, sendo levantada a sugestão pelos autores, um alto grau de diversidade interlinhagens, posteriormente levando os mesmos a concluir que a produção de mutacina parece ter relevância clínica na colonização do *S. mutans* e possui ampla diversidade nessa espécie.

Outro fator que torna os estudos referentes aos perfis de mutacinas pode ser observado no trabalho de Nicolas *et al*. (2006). Os autores realizaram um estudo simples para a síntese e posterior processo de purificação de mutacinas, demonstrando que a seqüência de aminoácidos da mutacina H-29B produzida pelo cepa de *S. mutans* do tipo 29B é igual à já conhecida mutacina II. Essas observações levaram os autores a conclusão de que as linhagens de *S. mutans* com origens amplamente distintas podem levar a produção de uma alta diversidade de bacteriocinas similares.

Com relação ao desempenho das mutacinas, foi verificado que a Mutacina IV é regulada pela sua alta densidade celular tão bem como, por um sistema de regulação de competência (KRETH *et al*, 2006).

No Brasil, a incidência de colonização de *S. mutans* em crianças é extremamente precoce, se apresentando mesmo antes da erupção dentária dos indivíduos (ALVES, 2009; NOGUEIRA *et al*, 2009). Essa colonização precoce pode estar associada ao alto consumo de sacarose e contato com indivíduos infectados (MAKI, 2014; SAKAYORI *et al*, 2014), além do sistema imunológico imaturo dessas crianças. O *Streptococcus mutans* também pode se apresentar em altos níveis mesmo em crianças que não apresentam cáries (CARLSSON *et al*, 1985; MATEE *et al*, 1993; MATTOS-GRANER *et al*, 2001).

Em relação ao acompanhamento da saúde bucal, a análise de dentes cariados, perdidos e obturados (Índice CPO-D) ainda é um método que, por sua enorme abrangência, é considerado o mais aceito e recomendado pela OMS para diversas faixas etárias e, em destaque, para crianças com idade escolar (BREUKINK, 2006; KRUIJFF, 2006)

. Com base nos valores do índice CPO-D para a idade de 12 anos, foi verificado uma consistente e constante tendência de declínio em relação à na prevalência da doença entre escolares no período de 1968 –1996 no Brasil. Entre 1980 e 1996 a redução nos valores do índice CPOD aos 12 anos foi da ordem de 57,8%(BUISCHI, 1997; AXELSSON, 2007). Enquanto de 1980 a 2010 houve uma queda do índice de CPO-D, saindo da alta prevalência de cáries (CPO-D = 7,3) em 1980 e chegando a baixa prevalência de cáries (CPO-D = 2,1) em 2010 (BOLZAN, 2015), se mostrando expressiva e amplamente significativa.

O mais recente levantamento epidemiológico de saúde bucal promovido pelo Ministério da Saúde confirmou essa tendência de queda na presença de cárie nos escolares brasileiros (CAO, 2016; FAN *et al*, 2016). Porém, se quase desconhece a relação entre esses índices nos municípios brasileiros, visto que os dados publicados pelo Ministério da Saúde se mostram generalistas e não específicos e próprios de cada município. Ainda não são grandes os estudos brasileiros sobre saúde bucal no que se refere a prevalência de cárie, quando comparado a países que apresentam seu IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) maior.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi cadastrada no Sistema Nacional de Informação sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (SISNEP) sob o protocolo no 60709416.4.0000.5501 e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade de Taubaté (UNITAU).

Foi realizado um estudo epidemiológico analítico transversal, onde a população foi constituída por um total de 82 escolares de 12 anos de idade, regularmente matriculados nas escolas urbanas da rede municipal de ensino de Taubaté-SP. As amostras de saliva foram coletadas de acordo com o trabalho de Cunha Vasques, M.C (2018) que, posteriormente, foram congeladas a -6°C e utilizadas nesse trabalho.

Para a escolha das escolas municipais, foi levada em consideração a divisão dos bairros em Regiões: Norte, Sul, Leste e Oeste. Foi escolhido um bairro representativo de cada uma das regiões: Parque Aeroporto (Norte); São Gonçalo (Sul); Água Quente (Leste) e Jardim Santa Tereza (Oeste) (Figura 1.). Todos os bairros escolhidos se tratam de nível socioeconômico baixo e com acesso limitado a serviços odontológicos. As coletas foram divididas em letras conforme a ordem cronológica de realização das mesmas, ou seja, A (Oeste); B (Sul); C (Leste) e D (Norte).

Figura 1 – Mapa do município de Taubaté, representativo das regiões analisadas



Após a seleção das escolas, também realizada por representatividade no bairro, foi requerida a autorização da Secretaria Municipal de Educação e, em seguida, foram feitos os primeiros contatos com os diretores das respectivas escolas para explicar como se daria o estudo proposto. Com o consentimento prévio dos diretores iniciou-se a seleção, por meio das listas de presença, de escolares de ambos os sexos. Em um contato prévio com os alunos selecionados foi entregue o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aos pais ou responsáveis diretos de acordo com a letra “a”, do item IV.3, da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e o Termo de Assentimento do Menor segundo a Resolução 466/12 Conselho Nacional de Saúde, para o consentimento do próprio aluno.

O exame clínico intra-bucal de cada estudante foi feito por uma única examinadora, previamente calibrada, auxiliada por uma anotadora. Tal exame foi realizado por meio de inspeção visual, com o escolar sentado em uma cadeira, de frente para a examinadora em salas com boa iluminação, escolhidas de forma prévia pelo(a) diretor(a). Foram utilizados equipamentos de proteção individual (luvas, gorros, máscaras) e espátulas de madeira, gazes descartáveis e espelhos bucais.

Para a avaliação da prevalência de cárie dentária foi utilizado o Índice CPO-D, segundo critérios de diagnóstico da Organização Mundial de Saúde (OMS) (BRETAS, 2008).

1 Tabela - Classificação da OMS para valores CPO-D médio em uma população, considerando 12 anos de idade

Valor médio do CPO-D	Prevalência de cáries na população
0 a 1,1	Muito baixa
1,2 a 2,6	Baixa
2,7 a 4,4	Média
4,5 a 6,5	Alta
6,6 ou maior	Muito alta

Para verificar da presença de *S. mutans* e o fator de virulência mutacina IV, foi utilizado 500 µL de cada amostra de saliva, descongelada a temperatura ambiente, onde foi homogeneizada (agitador de tubos tipo Vortex®, Phoenix, AP56, Araraquara, São Paulo, BR) e centrifugados por 10 minutos (4690×g).

Após remoção do sobrenadante, 200µL de matriz comercial de extração e purificação de DNA (Instagene, Bio-Rad®) foram adicionados ao *pellet* formado. Após homogeneização por 10 segundos, o material foi mantido em banho-maria por 30 minutos a 56°C. O material foi novamente homogeneizado por 30 segundos e mantido por mais dez minutos em banho-maria a 100°C.

A conclusão do processo de extração e purificação ocorreu pela homogeneização por 30 segundos e centrifugação (4690×g) por três minutos. O método de PCR utilizado para a identificação da espécie de *S. mutans* foi baseado no protocolo descrito por CHEN et al (2007). Além disso também foi utilizado em todas análises o controle negativo e o leader. A reação de amplificação para a detecção da presença de mutacina IV foi realizada em um volume final de 15 µL contendo 10 a 20 ng de DNA e para amplificação foi utilizada o reagente GoTaq® Hot Start Green Master Mix (Promega, São Paulo, BR), a ele foi adicionado 0,2 µL de cada iniciador (10 µM/µL). Os primers utilizados estão descritos na Tabela 1.

As condições e etapas para a realização da PCR foram: desnaturação inicial de 95°C por 5 min, 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 30s, anelamento de 60°C para *S.mutans* e 56°C para os demais primers por 45s, extensão de 72°C por 1 min e extensão final de 72°C por 10 min. Para realização da PCR, foi utilizado o termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 1,5% em TAE, corados com 1 µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen, Carlsbad, CA) e visualizados em um transiluminador UV (Gibco BRL, modelo TFX 20M, LIFE TECHNOLOGIES, EUA). Para o registro e arquivamento foi utilizado o sistema de foto documentação KODAK Digital Science.

2 Tabela – Primers utilizados no presente estudo

Primer	Fragmento	*TF	Referência
<i>S. mutans</i>	F:TCGCGAAAAAGATAAACAAAC A	749pb	Chen, et al. 2007
	R: GCCCCTTCACAGTTGGTTAG		
Mutacina IV	F: AGTTTTGGTGGAGATAAAC	4 156pb	Umeko et al., 2008
	R: TCAAAACCCACCTCTATTTG		

*TF = Tamanho do Fragmento

4. RESULTADOS

Levando em consideração apenas amostras com a presença do *S. mutans* previamente identificado, foram analisadas apenas 75 amostras de 82 amostras coletadas no total, sendo elas divididas em 04 coletas.

Foi verificado a presença do gene de Mutacina IV nas cepas de *S. mutans* em todas as coletas realizadas, ou seja, em todas as escolas visitadas, independente da localização geográfica.

A prevalência de cárie na população total estudada foi de 44% e o índice de CPO-D foi de 2,28. Foi verificada diferença significativa com relação ao Índice CPO-D entre as escolas das diferentes regiões estudadas ($p=0,0405$). Houve diferença significativa Região Sul e Oeste ($p=0,0310$) e entre as Regiões Sul e Leste ($p=0,0209$). Os índices de CPO-D das escolas estudadas por bairro foram: Parque Aeroporto, região Norte, (CPOD = 2,7); São Gonçalo, região Sul, (CPO-D = 1,4); Água Quente, região Leste, (CPOD = 3,2) e Jardim Santa Teresa, região Oeste, (CPO-D = 2,7). Onde, o índice o maior índice de CPO-D é encontrado na região Leste, seguido da região Oeste, Norte e posteriormente, Sul.

Para as amostras recolhidas na região Oeste verificamos a menor incidência de cepas com a presença da Mutacina IV, que apresentaram um média de 2,7 no índice de CPO-D, mas não representa a coleta referente ao bairro com menor média no índice de CPO-D (1,4).

Na da região Sul apresentaram uma incidência baixa de presença de Mutacina IV nas cepas de *S. mutans* analisadas, ou seja, menos de 50% da população analisada. É possível observar que os menores índices de CPO-D demonstraram uma maior ausência do fator de virulência Mutacina IV.

A região Leste foi a região que apresentou a maior média no índice de CPO-D (3,2), porém para a porcentagem de presença do gene de Mutacina IV nas cepas de *S. mutans* se mostrou menor comparado a porcentagem de cepas com a ausência desse fator de virulência.

Já para os escolares da região Norte foi a população que apresentou a porcentagem de presença do gene de Mutacina IV nas cepas de *S. mutans* superior a porcentagem de cepas com ausência desse fator de virulência, mesmo sendo a

região que não diferiu estatisticamente no índice de CPO-D com a região Sul, que se refere a região com menor índice de CPO-D encontrado neste estudo (1,4).

3 Tabela – Tabela representativa das análises dividida por região, amostras que apontaram presença de mutacina IV de *Streptococcus mutanse* o índice CPO-D da região

	Amostras	Mutacinas (+)	CPO-D
NORTE (A)	23	1	2,7
SUL (B)	23	8	1,4
LESTE (C)	25	10	3,2
OESTE (D)	13	7	2,7

5. DISCUSSÃO

Estudos da biodiversidade de espécies cariogênicas podem ser promissores, principalmente se associados às análises dos fatores de virulência e patogenicidade dos principais agente etiológicos da cárie dental (RODRIGUES *et al*, 2008), isto é, o estudo do *S. mutans* e seus genes de virulência (mutacinas) se mostra como essencial para compreensão, profilaxia e estudo de ocorrências em estudos cariogênicos.

Diferentes mutacinas se apresentam para diferentes funções durante o processo de colonização do *S. mutans*. A Mutacina IV mostra ser importante na fase inicial de colonização, eliminando os colonizadores primários como os *S. sanguinis*, já que seu espectro antimicrobiano é específico contra essas espécies. Após o estabelecimento do *S. mutans* na superfície dental, se inicia a síntese de Mutacina I, pelas células do biofilme, agindo na inibição de competidores potenciais de diversas espécies, enquanto o espectro antimicrobiano da mutacina IV é especificamente contra membros do grupo *mitis* de estreptococos bucais. (CHATERJEE, 2005; PAUL *et al.*, 2005)

Visto que a produção de mutacina pelo *S. mutans* pode favorecer sua instalação, colonização e aumentar o risco de cárie, foi investigado nesta pesquisa a frequência dos genes para Mutacina IV em linhagens de *S. mutans* isoladas de escolares com diferentes experiências de cárie dentária. Dentro desse contexto, é importante ressaltar que a presença do gene Mutacina IV nas cepas de *Streptococcus mutans* analisadas não indica necessariamente que o *Streptococcus mutans* produza o fator de virulência Mutacina IV continuamente.

Diante aos resultados apresentados no presente estudo, a relevância dos dados pode ser apontada como alta, diante da baixa disponibilidade de dados que relacionam o índice de cárie e presença de fatores de virulência como as mutacinas disponibilizado nos municípios, principalmente em países em desenvolvimento, onde esses dados para escolares de 12 anos se mostram escassos.

De acordo com a literatura, as comparações se mostram conflituosas visto que os parâmetros de análise dos estudos epidemiológicos em escolares de 12 anos no

Brasil, em relação à seus critérios de diagnóstico e amostragem, não são uniformes. Além disso, tais informações se mostram extremamente genéricas e de cunho Estadual e ou Federal, não abordando os municípios como dados individuais em sua maioria.

A capacidade de produção de mutacina pode facilitar a instalação e colonização de *S. mutans* no biofilme dentário aumentando significativamente o risco de cárie (KAMIYA *et al*, 2005). Entretanto, alguns autores não encontraram associação entre atividade mutacínica e o número de *S. mutans* ou a incidência de cárie (ALALUUSUA *et al*, 1991) (LONGO *et al*, 2003), enquanto outros mostram uma associação positiva entre as proporções de *S. mutans* com o total de estreptococos bucais e o potencial mutacínico. (RODRIGUES *et al*, 2008). Ao fim, mostraram produção distinta de mutacinas entre *S. mutans* isolados de indivíduos adultos livres de cárie e com cárie ativa. (KAMIYA *et al*, 2005)

Enquanto a presença de Mutacina IV nas colonizações por *S. mutans*, para pré-escolaresse mostrou evidente e recorrente em crianças que já apresentaram cáries em algum momento de sua vida (RODRIGUES *et al*, 2008), os resultados do presente estudo, nas amostras obtidas, para crianças de 12 anos, aponta que essa relação é inconclusiva, visto que não foi possível associar o índice CPO-D com a ocorrência de Mutacina IV de *S. mutans* nas amostras coletadas.

Em uma pesquisa de isolados clínicos de *S. mutans* para a presença do gene para a Mutacina IV por meio da PCR, encontraram >50% de resultados positivos (QI *et al*, 2001), no presente estudo a ocorrência não passou de 50% (27,08%).

Estes autores ainda sugerem que a Mutacina IV seria produzida para contribuir para que *S. mutans* elimine os colonizadores primários da superfície do dente e estabeleça sua própria população, o que se justifica se mostrar recorrente o maior número de achados do gene Mutacina IV em indivíduos cárie-ativos (KAMIYA *et al*, 2005) e se mostra importante para as primeiras etapas da colonização do *S. mutans*. (QI *et al*, 2001). Porém, no presente estudo, pode-se ser observado não haver diferença entre o número de crianças com ou sem experiência de cárie colonizada por genótipos de *S. mutans* produtores de mutacina, ou seja, a presença desse genótipo não influenciou na capacidade de desenvolver a cárie (NAPIMOGA *et al*, 2005), colocando em questão o fato de que a que a colonização por *S. mutans* produtores

de mutacinas poderia indicar indivíduos mais susceptíveis à cárie dentária. (RODRIGUES *et al*, 2008). Tal informação pode corresponder com os dados de que a Mutacina IV se mostra mais presente em amostras de indivíduos que já apresentaram cáries uma vez na vida (RODRIGUES *et al*, 2008).

6. CONCLUSÃO

Apesar de se observar a ocorrência significativa do fator de virulência Mutacina IV em cepas clínicas de *Streptococcus mutans* em escolares de 12 anos, não foi observado uma relação entre a presença da Mutacina IV e a incidência de cárie na população estudada. A partir destes resultados se comprova cada vez mais a complexidade dos estudos que visam estabelecer uma relação entre o fator de causa da incidência de cárie na população e o índice de CPO-D por exemplo, já que como destacado mais de uma vez neste estudo provem de um caráter multifatorial. E por isso estudos como esse se mostram cada vez mais urgentes para a montagem de um panorama deste tipo de problema de saúde pública nos municípios, para se instigar ações constantes por meio do poder público na rede escolar como forma de manterem os baixos índices de CPO-D.

REFERÊNCIAS

A.C, ALVES *et al.* **Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children.** **MICROBIOLOGY RESEARCH.** 2009. 476–481 p. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.005777-0>. Acesso em: 27 Fev. 2019.

ALALUUSUA, S *et al.* **Oral colonization by more than one clonal type of *mutans streptococcus* in children with nursing-bottle dental caries..** PUBMED. 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8712973>. Acesso em: 30 Abr. 2019.

BANAS, J.A; VICKERMAN, M.M. **Glucan-binding proteins of the oral *streptococci*.** PUBMED. 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12764072>. Acesso em: 1 Mai. 2019.

BOLZAN, P. **Variação do índice CPOD do Brasil no período de 1980 a 2010.** REV ODONTO. RIO DE JANEIRO, 2015. 35 p. Disponível em: http://revodontobvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72722015000100002. Acesso em: 1 Jun. 2016.

BONELLI, R.R *et al.* **Glucan-binding proteins of the oral *streptococci*.** PUBMED. 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12764072>. Acesso em: 1 Mai. 2019.

BOWDEN, G.H; HAMILTON, I.R. **Survival of oral bactéria.** PUBMED. CANADA, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9488248>. Acesso em: 1 Mai. 2019.

BOWEN, W.H; KOO, H. **Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms.** 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21346355>. Acesso em: 1 Mai. 2019.

BOWEN, W.H; KOO, H. **Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms.** PUBMED. ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2011. Disponível em: . Acesso em: 1 Mai. 2019.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Projeto SB Brasil 2010: resultados

principais. Brasília: Ministério da Saúde. **SB BRASIL 2010**, BRASÍLIA, 2012.

BREUKINK, E; KRUIJFF, B. **Lipid II as a target for antibiotics**. PUBMED. Netherlands. 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16531990>. Acesso em: 1 Mai. 2019.

BUISCH, YP; AXELSSON, P. **Controle mecânico da placa dental realizado pelo paciente**. São Paulo: Artes Médicas; 2. ed. SÃO PAULO, 1999, p. 45-63.

CAO , X *et al.* **Huazhong Immunogenicity and prediction of epitopic region of antigen Ag I/II and glucosyltransferase from *Streptococcus mutans***. PUBMED. CHINA, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27376814>. Acesso em: 1 Mai. 2019.

CARDOSO, J. **Microbiologia e Imunologia Oral**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 384 p.

CARLSSON, P; OLSSON, B; BRATTHAL, D. **The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique**. SCIEDIRECT. MOÇAMBIQUE, 1985. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003996985900433>. Acesso em: 1 Mai. 2019.

CAUFIELD, P.M; CUTTER, G.R; DASANAYAKE, A.P. **Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity**. PUBMED. ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 1993. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8418105>. Acesso em: 2 Mai. 2019.

CAUFIELD, P.W. **Dental caries--a transmissible and infectious disease revisited: a position paper..** PUBMED. 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9442545>. Acesso em: 2 Mai. 2019.

CHATTERJEE, C *et al.* **Biosynthesis and mode of action of lantibiotics**. PUBMED. ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15700960>. Acesso em: 2 Mai. 2019.

CHIKINDAS, M.L *et al.* **Mutacin II, a bactericidal lantibiotic from *Streptococcus mutans***. PUBMED. 1995. 39 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC163007/>. Acesso em: 1 Mai. 2019.

COSTERTON, J.W *et al.* **Microbial biofilms**. PUBMED. BOZEMAN, 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8561477>. Acesso em: 1 Mai. 2019.

CVITKOVITCH, D.G; LI, Y.H; ELLEN, R.P. **Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections**. PUBMED. 2003. 1626–1632 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14660736>. Acesso em: 2 Mai. 2019.

DAVIES, D. **Understanding biofilm resistance to antibacterial agents**. PUBMED. ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563302>. Acesso em: 1 Mai. 2019.

DODDS, MWJ; JOHNSON, DA; YEH, CK. **Health benefits of saliva: a review**. PUBMED. ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15725522>. Acesso em: 1 Mai. 2018.

DONLAN, R.M; COSTERTON, J.W. **Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms**. PUBMED. ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932229>. Acesso em: 20 Mai. 2019.

DUFOUR, A. **The biology of lantibiotics from the lacticin 481 group is coming of age**. PUBMED. França, 2007. 31 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17096664>. Acesso em: 1 Mai. 2019.

FAUSTOVA, M. O *et al.* **Bacterial factors of cariogenicity (literature review)**. MEDLIST. Disponível em: <http://wl.medlist.org/02b-2018-23/>. Acesso em: 1 Jun. 2019.

FONTANA, M. **The clinical, environmental, and behavioral factors that foster early childhood caries: evidence for caries risk assessment**. PUBMED. ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26063551>. Acesso em: 1 Mai. 2019.

GALVÃO, L. C. **Inactivation of the *spxA1* or *spxA2* gene of *Streptococcus mutans* decreases virulence in the rat caries model**. FAPESP. 2017. Disponível

em: <https://bv.fapesp.br/pt/publicacao/128847/inactivation-of-the-spxa1-or-spxa2-gene-of-streptococcus-mut/>. Acesso em: 1 Mai. 2019.

GRIGALAUŠKIENE, R; SLABSINSKIENE, E; VASILIAUSKIENE, I. **Biological approach of dental caries management**. PUBMED. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27189495>. Acesso em: 1 Mai. 2019.

HAMADA, S; SLADE, HD. **Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans***. PMC. 1980. 331–384 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373181/>. Acesso em: 1 Mai. 2019.

HECHARD, Y; SAHL, HG. **Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria**. PUBMED. FRANÇA, 2002. 84 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12423799>. Acesso em: 1 Mai. 2019.

HEILMANN, A; TSAKOS, G; WATT, R.G. **A Life Course Perspective on Health Trajectories and Transitions**. Burton-Jeangros C, Cullati S, Sacker A, Blane D, editors, 2015. 215 p. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK385362/pdf/Bookshelf_NBK385362.pdf. Acesso em: 2 Jun. 2019.

HENG, J.D *et al.* **Identification of nlmTE, the Locus Encoding the ABC Transport System Required for Export of Nonantibiotic Mutacin in *Streptococcus mutans***. PMC. 2005. 5036–5039 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1169533/>. Acesso em: 2 Mai. 2019.

HOFLING, J.F. **Association between *Streptococcus mutans*/*Streptococcus sobrinus* in students of different social levels and their relationship with the cariogenic activity in these populations**. SCIELO. SÃO PAULO, 1999. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0103-06631999000200012&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 2 Jun. 2019.

HOIBY, N. **The clinical impact of bacterial biofilms**. PUBMED. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21485309>. Acesso em: 6 Fev. 2019.

KAMIYA, R. U. **Frequency of four different mutacin genes in *Streptococcus mutans* geotypes isolated from caries-free and caries-active individuals**. PUBMED. PIRACICABA, 2005. 54 p.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15888470>. Acesso em: 2 Jun. 2019.

KEYES, P. H. **The infectious and transmissible nature of experimental dental caries: Findings and implications.** SCIENCE DIRECT.

MARYLAND, 1960. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003996960900911>.

Acesso em: 1 Fev. 2019.

KRETH, J *et al.* **Competition and Coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the Dental Biofilm.** JOURNAL OF MICROBIOLOGY. CALIFORNIA, 2005. 7193–7203 p. Disponível em:

<https://jb.asm.org/content/187/21/7193>. Acesso em: 2 Jun. 2019.

LIU, Y.L; NASCIMENTO, M; BURNE, R.A. **Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries.** PUBMED. FLORIDA, 2012. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22996271>. Acesso em: 2 Jul. 2019.

LOESCHE, W.J. **Nutrition and dental decay in infants.** THE AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION. 1985. Disponível

em:<https://academic.oup.com/ajcn/article/41/2/423/4691672>. Acesso em: 1 Mai. 2019.

LONGO, P; MATTOS-GRANER, R.; MAYER, M. **Determination of mutacin activity and detection of mutA genes in *Streptococcus mutans* genotypes from caries-free and caries-active children.** PUBMED. SÃO PAULO, 2003. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12753464>. Acesso em: 3 Jul. 2019.

MAKI, Y *et al.* **Monitoring Caries Risks before the Window of Infection and Later Caries Increment: A Caries Prediction Study on Rapid Detection of *Streptococcus mutans* Using Monoclonal Antibodies.** PUBMED. TOKYO, 2014. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24717926>. Acesso em: 7 Jul. 2019.

MANJI, F; DAHLEN, G; FEJERSKOV, O. **Caries and Periodontitis: Contesting the Conventional Wisdom on their Aetiology.** PUBMED.

CANADÁ. 52 p. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29694978>. Acesso em: 7 Jul. 2019.

MARSH, P.D. **Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries.** PUBMED. 1999. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10553246>. Acesso em: 7 Jul. 2019.

MARTÍNEZ-PABÓN, M.C; MORALES-UCHIMA, S M.; MARTÍNEZ-DELGADO, C. M. **Caries dental en adultos jóvenes en relación con características microbiológicas y fisicoquímicas de la saliva**. SCIELO. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/pdf/rsap/v15n6/v15n6a07.pdf>. Acesso em: 2 Set. 2019.

MATTEE, M.I.N. **Mutans streptococci in caries-active and caries-free infants in Tanzania**. Wiley Online Library. TANZANIA, 1993. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-302X.1993.tb00582.x>. Acesso em: 1 Mai. 2016.

MATTOS-GRANER, R.O *et al.* **Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission..** PUBMED.BOSTON, 2001. 39 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11376080>. Acesso em: 1 Mai. 2019.

MERRIT, J; QI, F. **The mutacins of *Streptococcus mutans*: regulation and ecology**. PUBMED. OKLAHOMA, 2011. 27 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22394465>. Acesso em: 7 Jul. 2019.

NAPIMOGA, M. H. **Transmission diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes**. PUBMED. PIRACICABA, 2005. 47 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16050484>. Acesso em: 8 Ago. 2019.

NARVAI, P.C. **Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX**. RESEARCH GATE. SÃO PAULO, 2000. 392 p. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/232702086_Carie_dentaria_e_fluor_uma_relacao_do_seculo_XX. Acesso em: 7 Jul. 2019.

NGUYEN, T *et al.* **Genes involved in the repression of mutacin I production in *Streptococcus mutans***. PUBMED. 2009. 155 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19202103>. Acesso em: 2 Mai. 2019.

NICOLAS, G.G; LAVOIE, M.C. [***Streptococcus mutans* and oral streptococci in dental**

plaque]. PUBMED. QUEBEC, 2011. 55 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21217792>. Acesso em: 1 Abr. 2019.

NOBBS, A.H; LAMONT, R.J; HF, JENKINSON. ***Streptococcus adherence and colonization***. PUBMED. 2009. 73 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19721085>. Acesso em: 7 Set. 2019.

NOGUEIRA, R.D. **Salivary IgA antibody responses to *Streptococcus mitis* and *Streptococcus mutans* in preterm and fullterm newborn children**. PUBMED. 2012. 57 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22169809>. Acesso em: 1 Set. 2019.

NOVAK, J; CAUFIELD, P.W; MILLER, E.J. **Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from *Streptococcus mutans***. Journal of Bacteriology. 176 p. Disponível em: <https://jb.asm.org/content/176/14/4316>. 1994. Acesso em: 5 Ago. 2019.

OLD, L.A; LOWES, S; RUSSEL, R.R. **Genomic variation in *Streptococcus mutans*: deletions affecting the multiple pathways of B-glucoside metabolism**. PUBMED. NEWCASTLE, 2006. 21 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16390337>. Acesso em: 1 Set. 2019.

OPPENHEIM, F. G. **Salivary proteome and its genetic polymorphisms. Annals of the New York Academy of Sciences**. THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES. NEW YORK, 2007. 38 p. Disponível em: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1196/annals.1384.030>. Acesso em: 1 Fev. 2019.

PARROT, M; CAUFIELD, PW; LAVOIE, MC. **Preliminary characterization of four bacteriocins from *Streptococcus mutans***. <https://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m90-022?journalCode=cjm#.XfkKMWRKjIU>. CANADÁ, 1990. 36 p. Disponível em: <https://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m90-022?journalCode=cjm#.XfkKMWRKjIU>. Acesso em: 2 Ago. 2019.

QI, F; CHEN, P; CAULIFIELD, PW. **The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV**. PUBMED. 2001. 67 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11133423>. Acesso em: 1 Abr. 2019.

RODRIGUES, M.R *et al.* **Análise do sorotipo e dos genes para mutacinas em *Streptococcus mutans* isolados de pré-escolares com diferentes experiências de cárie.** BRAZILIAN DENTAL SCIENCE. 2008. 40 p. Disponível em: <https://ojs.ict.unesp.br/index.php/cob/article/view/665/561>. Acesso em: 1 Jul. 2019.

RODRIGUES, M.R *et al.* **do sorotipo e dos genes para mutacinas em *Streptococcus mutans* isolados de pré-escolares com diferentes experiências de cárie.** RESEARCH GATE. PARANÁ, 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/279338085_Analise_do_sorotipo_e_dos_genes_para_mutacinas_em_streptococcus_mutans_isolados_de_pre-escolares_com_diferentes_experiencias_de_carie. Acesso em: 7 Jul. 2019.

SEOW, WK. **Biological mechanism of early childhood caries.** **Community Dentistry Oral Epidemiology.** PUBMED. AUSTRALIA, 1998. 26 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9671196>. Acesso em: 1 Jun. 2019.

TAKANASHI, N; B, NYVAD. **The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives.** PUBMED. 2010. 90 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20924061>. Acesso em: 8 Ago. 2019.

TSANG, P *et al.* **Identification of genes associated with mutacin I production in *Streptococcus mutans* using random insertional mutagenesis.** PUBMED. LOS ANGELES, 2005. 151 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339939>. Acesso em: 5 Jun. 2019.

TWOMEY, D *et al.* **Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications.** SPRINGERLINK. 2002. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1020660321724>. Acesso em: 2 Jul. 2019.

VASQUES, M.C. **Prevalência de cárie: relação com fatores físico-químicos salivares e fatores de virulência de *Streptococcus mutans*.** REPOSITÓRIO UNITAU. TAUBATÉ, 2018. 66 p. Disponível em: <http://repositorio.unitau.br/jspui/handle/20.500.11874/1323>. Acesso em: 1 Fev. 2019.

World Health Organization. **Oral health surveys: basic methods.** School of Dentistry, University of São Paulo, Brazil, 2013. 125 p.

