



***Streptococcus* spp em cavidade bucal: biologia da reprodução e caracterização fenológica, genética e sorológica de isolados**

Jotta Junior Novaes, Thaís Tiemi Yoshinaga, Handressa Magalhães Ferreira, vitelhe Ferreira de Almeida, Fabiana da Silva Vieira Matrangolo, Sérgio Avelino Mota Nobre

Introdução

As bactérias residentes na cavidade bucal humana, pertencentes ao grupo mutans (*Streptococcus mutans* - sorotipo *c, e, f* – e *Streptococcus sobrinus* – sorotipos *d e g*) estão ligadas diretamente a uma doença resultante da descalcificação dos dentes, a cárie. Isso se dá pela excreção de ácidos após a formação de biofilmes na superfície dos dentes, que está diretamente aliado com hábitos irregulares de limpeza [1]. A habilidade de utilizar manitol ou sorbitol como fonte de energia primária para crescimento e produzir acetoina é uma das características usadas para distinguir os grupos de bactérias cariogênicas referidas como mutans de outros estreptococos [2]. Apesar da fácil diferenciação de *S. mutans* para *S. sobrinus*, devido diferenças morfológicas nas colônias em Ágar MSB (Mitis Salivarius Bacitracina) e testes como aglutinação de dextrano. Adicionalmente usa-se da diferenciação genética na produção da enzima GTF (glicosiltransferase) relacionando-a com a produção de polissacarídeo extracelular a partir de glicose que por sua vez promove a adesão celular e relaciona-se a virulência da bactéria [3]. Considerando a importância destes microrganismos para a saúde bucal humana, bem como a complexidade das variáveis relacionadas com *fitness* e sucesso etiológico dos *Streptococcus* grupo *mutans*, conduziu-se este trabalho. O objetivo deste trabalho foi organizar e quantificar registros, a partir da literatura científica, relacionados ao cultivo e reprodução, bem como das estratégias utilizadas para caracterizar cepas de *S. mutans* e *S. sobrinus* quanto à fenologia, genética e sorologia.

Material e métodos

O trabalho foi conduzido na forma de revisão bibliográfica usando a coleção principal da base de busca *Web of Science*, da *Thomson Reuters Scientific*. Para o levantamento quantitativo foram usados como descritores: (i) Cultivo, (ii) fenotipagem, (iii) genotipagem e (iv) sorotipagem, com intuito de evidenciar modos de identificação, caracterização e sequenciamento de diferentes sorotipos das espécies de *S. mutans* e *S. sobrinus* ao longo dos últimos 15 anos.

Desenvolvimento

A diversidade de microrganismos associados à microbiota bucal humana é enorme, assim como os fatores que alteram o modo de interação e crescimento. A infecção em humanos causada por estreptococos do grupo mutans estão associadas à formação de placas na superfície do dente e infecção no trato respiratório. A possibilidade de formação de biofilme é uma característica importante, em estreptococos essa capacidade é bem conhecida, e define uma interação danosa ao hospedeiro. A formação de biofilme permite ao patógeno adquirir resistência ao ambiente ácido, até mesmo causado pelo aumento populacional. A cárie é uma doença multifatorial, contudo bastante relacionada à presença de estreptococos, que tem como facilitadores a alimentação hiperglicídica e a má qualidade ou frequência na assepsia bucal [4].

A espécie *S. mutans* possui quatro sorotipos (*c, e, f e k*) possui de 36-38% de guanina e citosina.mol⁻¹, não são capazes de hidrolisar arginina, são fermentadoras de rafinose e melibiose, sem produção de H₂O₂ com crescimento aeróbico. São resistentes à bacitracina, possuindo parede celular composta por dois açúcares (glicose e ramnose) e parede de peptídeo glicano composta por lisina e alanina. Com 44-46% de guanina e citosina por mol, a *S. sobrinus* com dois sorotipos (*d e g*), diferente da espécie *S. mutans* ela produz H₂O₂, parede celular de açúcares (glicose, galactose e ramnose) e peptídeo glicano constituída de lisina e treonina[5]. O sorotipo *c*, completamete sequenciado em 2002, é composto de 2,030,936 pares de bases com 1963 fases de leitura (o que compreende à regiões com códons de início e parada, excetuando-se os íntrons, quando estes presentes). A classificação dos sorotipos é baseada na composição química da parede de polissacarídeos, as diferenças dos sorotipos consiste em ligações de ramnose α -1,2 e α -1,3 ligado à resíduos glicosídicos α -1,2- (sorotipo *c*), β -1,2- (sorotipo *e*) e α -1,3- (sorotipo *f*), com exceção do sorotipo *k*, que não ocorre a ligação de outro açúcar à ramnose[6]. A parede celular de *S. sobrinus* possui dois diferentes polisacarídeos, variando entre galactose-glicose (α -1,6-diglicose) e ramnose-glicose (3-1,6-diglicose) caracterizando a espécie.



A enzima responsável pela formação da placa bacteriana é sintetizada e entra em ação após a entrada de sacarose, metabolizam e excretam glicanos, aumentando a parede extracelular e conseqüentemente a ligação de mais bactérias [5]. Atualmente se encontra descrito três tipos da enzima (GTFB, GTFC e GTFD) que estão envolvidas na adesão à superfície dos dentes que é dependente de sacarose. As enzimas responsáveis pela síntese de glicanos insolúveis em água, GTFB e GTFC, polimerizam ligações entre carboidratos por ligações glicosídicas. Já a enzima GTFD é sintetizada quando ainda planctônicos, produzindo glicanos que são solúveis em água.

Os meios de cultura utilizados para crescimento de *S. mutans* contém em sua composição bacitracina, devido sua resistência, tornando o meio seletivo, e geralmente açúcar, para fomentar o crescimento. O ágar MS (Mitis Salivarius) foi um dos primeiros meios a serem desenvolvidas, a adição de bacitracina e sacarose diminuiu o desenvolvimento de enterococos, outra modificação no meio foi a adição de outro antibiótico, a canamicina, aumentando ainda mais a seletividade por *S. mutans* e inibindo *S. mitis*, *S. arginosus* e *Candida* spp. Segundo Wan *et al* [8] o meio TYCB (*tryptone-yeast-cystine-sucrose-bacitracin*) mostra-se melhor quando comparado com os meios convencionais para cultivo, apesar de ser proposto em literaturas que a utilização em diferentes concentrações de bactérias assim como na utilização para recuperação celular, esta implicando uma necessidade de alta sensibilidade. Levando de 15-20 gerações para um crescimento balanceado. *S. sobrinus* possui crescimento semelhante a *S. mutans* em diferentes tipos de açúcares, assim como seu comportamento de morte inicial e supressão depois das 12h [9].

A cavidade bucal pode conter mais de um genótipo de estreptococos, mesmo após uso de gel de clorexidina. São diversos os estudos indicam que o consumo de carboidratos fermentáveis favorece a instalação de certos genótipos que são mais aptos a sobreviver em ambientes ricos em sacarose, porém a diversidade de genótipos não está associada diretamente com o desenvolvimento da cárie. Assim, diferente do que se acreditava a diversidade genotípica não prega um papel principal no processo de desenvolvimento da doença, podendo ser causada por clones de um único genótipo. Alguns fatores como a formação de biofilme, produção de mutacina e potencial cariogênico se mostram variantes entre as espécies [10].

Conclusões

Considerando os indexadores em estudo, pode-se deduzir que a comunidade científica investiga com maior intensidade a espécie *S. mutans* do que a *S. sobrinus*. Os relatos envolvendo cultivo para ambas as espécies são numericamente mais expressivos, sendo justificado pela exigência desta etapa para desenvolver as formas de tipagem. A partir deste indexador evidenciou-se uma tendência crescente para *S. mutans*, enquanto para *S. sobrinus* a produção ocorreu de forma errática. Quando considerado os indexadores de fenotipagem, genotipagem e sorotipagem, a intensidade dos relatos diminuiu consideravelmente, seguindo um ritmo pouco variável para *S. mutans*, com produção da ordem de 5-15 artigos por ano envolvendo sorotipagem, assunto este o mais reportado entre as três modalidades de tipagem, independente da espécie. Apesar do generalizado crescimento das ferramentas envolvendo marcadores genéticos, não foi observada nenhuma tendência ascendente de reportagens sobre genotipagem para nenhuma das espécies. Estudos envolvendo fenotipagem de *S. sobrinus* foram desconsiderados em quase totalidade do período considerado. (Figuras 1 e 2).

Referências

- [1] MATTOS-GRANER R. O. *et al.* Cloning of the *Streptococcus mutans* Gene Encoding Glucan Binding Protein B and Analysis of Genetic Diversity and Protein Production in Clinical Isolates. *American Society for Microbiology: Infection and Immunity*, Nov. 2001, p. 6931-6941;
- [2] MARYANSKI, J. H.; WITTENBERGER, D C. L. Mannitol Transport in *Streptococcus mutans*, *Journal of Bacteriology*, Dec. 1975 p. 1475-1481;
- [3] YOSHIDA, A.; KURAMITSU, H. K. *Streptococcus mutans* biofilm formation: utilization of a *gtfB* promoter-green fluorescent protein (*PgtfB::gfp*) construct to monitor development, Department of Oral Biology, State University of New York: *Microbiology* (2002), 148, 3385-3394;
- [4] HOSHINO, T., *et al.* PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 48 (2004) 195-199, September, 2003;
- [5] BARBIERI, D. S. V. Análise da Aderência "In Vitro" de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na superfície dentária. Dissertação (Mestrado) Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia - Área de Concentração: Microbiologia - Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005;
- [6] NAKANO, K.; OOSHIMA, T. Serotype polysaccharide antigens of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiology*. (2009) 4(7), 891-902;
- [7] LINZER, R. *et al.* Structural Studies of the Rhamnose-Glucose Polysaccharide Antigen from *Streptococcus sobrinus* B13 and 6715-T2. *Infection and Immunity*, November, 1985, p. 583-585.
- [8] WAN, A.K.L. *et al.* Comparison of five selective media for the growth and enumeration of *Streptococcus mutans*. *Australian Dental Journal* 2002;47:(1):21-26;



- [9] PEREIRA, C. V *et al.* *In Vitro Bacterial Plaque Suppression And Recolonization By S. Mutans And S. Sobrinus*. *Brazilian Journal of Microbiology* (2006) 37;
- [10] 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 Microbiology Immunology* 2007; 22: 313–319.

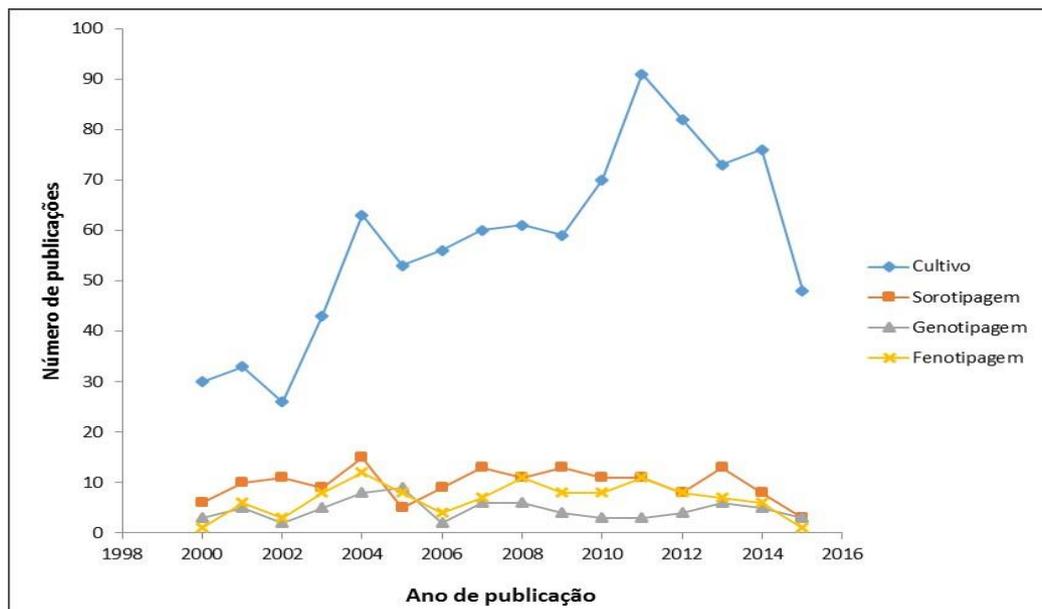


Figura 1. Número de artigos científicos publicados em periódicos indexados na base *Web of Science* no período de 2000 a 2015 envolvendo cultivo, sorotipagem, genotipagem e fenotipagem de *S. mutans*.

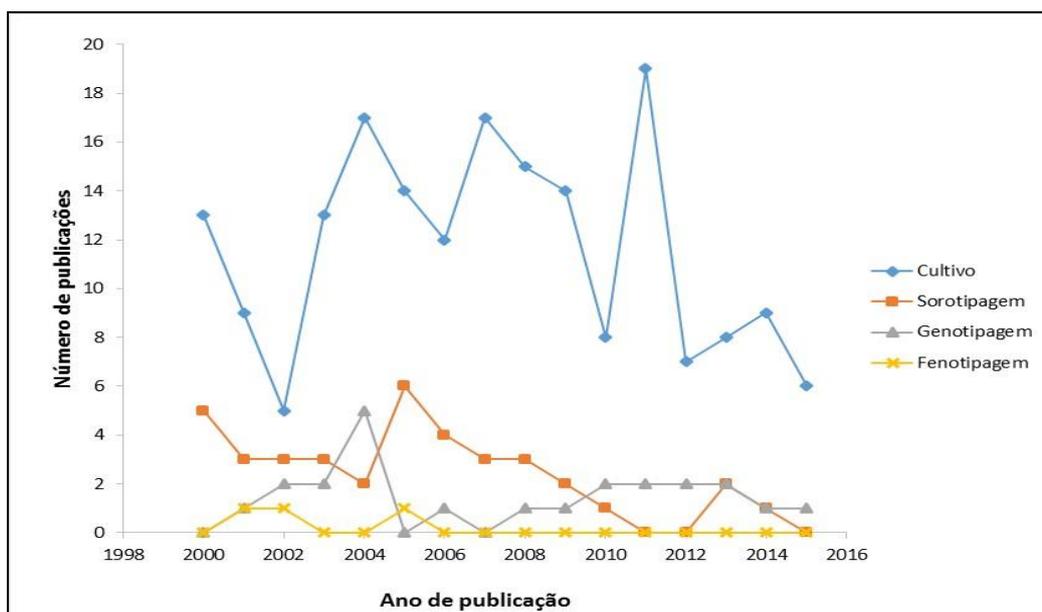


Figura 2. Número de artigos científicos publicados em periódicos indexados na base *Web of Science* no período de 2000 a 2015 envolvendo cultivo, sorotipagem, genotipagem e fenotipagem de *S. sobrinus*.



o FEPEG | FÓRUM DE ENSINO,
PESQUISA, EXTENSÃO
E GESTÃO

TRABALHOS CIENTÍFICOS APRESENTAÇÕES ARTÍSTICAS E CULTURAIS DEBATES MINICURSOS E PALESTRAS

23 A 26 SETEMBRO DE 2015
Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

ISSN 1806-549X

A HUMANIZAÇÃO NA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

