

DIVERSIDADE GENOTÍPICA DE STREPTOCOCCUS MUTANS NA SALIVA APÓS TRATAMENTO INTENSIVO COM CLOREXIDINA

Fabiana Uchôa Gouveia Rolim*, Cinthia Pereira Machado Tabchoury, Gláuber Campos Vale

113

Introdução

Entre as bactérias orais, os *Streptococcus mutans* (SM) foram identificados como o agente etiológico primário associado com a iniciação das cáries dentárias em seres humanos¹. Estudos demonstraram que a cavidade oral abriga uma diversidade genotípica de SM na saliva e biofilme dental². Essa variedade genotípica ocasionaria características diferentes de virulência, o que poderia aumentar a capacidade deste microrganismo de colonizar a cavidade oral³. A clorexidina (CHX) é um agente de largo espectro antimicrobiano. O seu mecanismo de ação é baseado na atração iônica entre esta e a membrana celular bacteriana. Em baixas concentrações, o efeito bacteriostático é baseado no distúrbio das funções das células bacterianas e em alta concentração tem a capacidade de desorganizar o metabolismo bacteriano (precipitação e coagulação de proteínas) o que lhe confere um potencial bactericida⁵. Logo, A CHX utilizada em diferentes concentrações é eficiente para reduzir os níveis de contagem de SM na saliva⁶. Entretanto, pouco se sabe sobre a ação da mesma em relação à variação genotípica destes microorganismos.

Objetivo

Avaliar a diversidade genotípica de *Streptococcus mutans* após tratamento intensivo com clorexidina.

Metodologia

Após ser aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP (Protocolo 039/2006). A saliva estimulada de 3 voluntários adultos com fluxo salivar normal foi coletada antes e após 1, 7, 14, 21 e 28 dias da aplicação do gel de CHX 1% nos voluntários por 2 dias consecutivos. Em cada dia, realizou-se 3 aplicações do gel utilizando moldeiras descartáveis por 5 minutos com intervalos de 5 minutos entre as aplicações. Para a análise microbiológica, a saliva foi diluída serialmente e dispensada em meio específico para a determinação de SM. As unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e os resultados expressos em UFC/mL de saliva. Oito cepas de SM foram isoladas em cada tempo e armazenadas em Skim milk a -20°C para posterior análise genotípica. Para a extração e purificação do DNA dos isolados foi utilizado o kit de purificação de DNA—MasterPure® (EPICENTRE Technologies, Madison, Wis. - EPIC-MCD85201), seguindo-se as orientações do fabricante. Para a confirmação molecular de *S. mutans* dos isolados foi realizada reação da polimerase em cadeia (PCR) com primers espécie-específicos⁷, desenhados para amplificar a região do gene da *gtfB*: 5'-ACTACACTTTCGGGTGGCTTGG-3' e 5'-CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC-3'. A reação de polimerase em cadeia com "primers" arbitrários (AP-PCR) foi realizada com "primer" OPA-02, já que o mesmo apresenta melhor poder discriminatório de *S. mutans*, segundo Li & Caufield⁸ de sequência 5'-TGCCGAGCTG-3'. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão de corrida de Tris-Borato-EDTA⁹. Em cada gel, foi incluído um padrão de peso

molecular de 250 pb (DNA ladder; INVITROGEN - Life Technology do Brasil). Após o término de cada corrida, o gel foi corado com brometo de etídio a 0,5 mL/mL (INVITROGEN – Life Technology do Brasil) por dez minutos. As imagens (bandas) foram capturadas com um sistema de imagens digital (Alpha IS-200; Innotech Corp., San Leandro, Calif). A documentação fotográfica dos géis foi elaborada em um sistema de imagem digital e analisada por um programa de computador, para a determinação da mobilidade relativa de cada banda. Os perfis de amplificação observados foram considerados similares ou iguais quando a maior parte das bandas era idêntica (padrões $\geq 99\%$ das bandas iguais), ao serem analisadas visualmente por um único examinador. Para os dados de contagem na saliva, foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnet considerando os voluntários como blocos estatísticos, com p fixado a 5% utilizando o software SPSS 12.0.

Resultados e Discussão

As contagens (media $\pm$ DP) de SM no baseline, 1, 7, 14, 21 e 28 dias foram respectivamente: $67,5 \pm 94,8 \times 10^4$; $0,15 \pm 0,17 \times 10^4$; $0,21 \pm 0,15 \times 10^4$; $0,94 \pm 0,68 \times 10^4$; $2,69 \pm 3,16 \times 10^4$; $4,26 \pm 6,27 \times 10^4$. O tratamento com CHX foi capaz de reduzir as contagens de SM mesmo após 28 dias da aplicação do gel ($p < 0,05$). Este resultado também foi obtido por Lakade10 e colaboradores que em 2014 constataram que o bochecho com Clorexidina a 0,2% por 1 min durante 15 dias, com frequência de duas vezes ao dia, reduziu significativamente a contagem de SM. Assim como, Wan11 e colaboradores que em seu estudo envolvendo bebês de 10 meses de idade, averiguaram que a escovação semanal com o gel de clorexidina a 2% reduz a contagem de SM com contagens iniciais de < 300 UFC / mL pelo período de 3 meses. Neste estudo, os genótipos encontrados no baseline foram igualmente encontrados nos outros períodos de avaliação (Tabela 1). Esta análise envolvendo a ação da clorexidina em relação à diversidade genotípica do SM é algo inédito na literatura. No entanto, encontram-se outros estudos envolvendo a diversidade genotípica do SM, porém, abordando outras intervenções. Damé-Teixeira12 e colaboradores, em 2014, analisaram a diversidade genotípica antes e após a remoção parcial da cárie de dentina e observaram que após o experimento esta foi reduzida. Por sua vez, Arthur3 e colaboradores observaram que biofilmes formados sob condição de alto desafio cariogênico podem apresentar genótipos de *S. mutans* mais acidúricos e mais acidogênicos.

Tabela 1. Genótipos de *Streptococcus mutans* (%) presentes na saliva estimulada antes (baseline) e após aplicação do gel de CHX 1% (n=3).

Voluntário	Baseline	Dias após aplicação de CHX				
		1	7	14	21	28
1	A (100)	A (100)	A (100)	A (100)	A (100)	A (100)
2	B (62,5)	B (100)	B (50)	B (37,5)	B (37,5)	B (100)
	C (37,5)		C (50)	C (62,5)	C (62,5)	
3	D (75)	D (75)	D (62,5)	D (50)	D (37,5)	D (62,5)
	E (25)	E (25)	E (37,5)	E (50)	E (62,5)	E (37,5)

A designação de genótipos por letras (A, B, C, etc) só é válida dentro de cada voluntário.

Conclusão

Os resultados confirmam que o gel de CHX reduz os níveis salivares de SM, mas, aparentemente, não altera sua diversidade genotípica.

Referências Bibliográficas

115

1. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev. 1980;44:331–384.
2. Tabchoury CPM, Sousa MCK, Arthur RA, Mattos-Graner RO, Del Bel Cury AA, Cury JA. Evaluation of genotypic diversity of *Streptococcus mutans* using distinct arbitrary primers. J Appl Oral Sci 2008;16:403-407.
3. Arthur, RA et al. Genotypic and phenotypic analysis of *S. mutans* isolated from dental biofilms formed in vivo under high cariogenic conditions. Braz. Dent. J. 2011; 22:4: 267-274.
4. Alam S, Brailsford SR, Whiley RA, Beighton D. PCR-Based methods for genotyping viridans group streptococci. J Clin Microbiol. 1999;37:2772–2776.
5. Koo H, Pearson SK, Scott-Anne K, Abranches J, Cury JA, Rosalen PL, et al. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. Oral Microbiology and Immunology 2002;17:337–43.
6. Jayaprakash R, Sharma A, Moses J. Comparative evaluation of the efficacy of different concentrations of chlorhexidine mouth rinses in reducing the mutants streptococci in saliva: An in vivo study. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2010 jul-aug;28:3.
7. Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushiama M, Koga T: Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol 2000;15:258-262.
8. Li Y, Caufield PW: Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutants streptococci from humans. Oral Microbiol Immunol 1998;13:14-22.
9. Mattos-Graner RO, Li Y, Caufield PW, Duncan M, Smith DJ: Genotypic diversity of mutants streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. Journal of Clinical Microbiology 2001;39(6):2313-2316.
10. Lakade LS, Shah P, Shirol D. Comparison of antimicrobial efficacy of chlorhexidine and combination mouth rinse in reducing the Mutans streptococcus count in plaque. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2014;32:91-6
11. Wan AKL, Seow WK, Purdie DM, Walsh LJ, Tudehope DI. The effects of chlorhexidine gel on streptococcus mutans infection in 10-month-old infants: a longitudinal, placebo-controlled, double-blind trial. Pediatric Dentistry. 2003;25:215-222.
12. Damé-Teixeira N, Arthur RA, Parolo CCF, Maltz M. Genotypic Diversity and Virulence Traits of *Streptococcus mutans* Isolated from carious Dentin after Partial Removal and Sealing. Scientific World Journal. 2014;1-13