

Universidade Estadual Paulista - UNESP  
Faculdade de Medicina de Botucatu  
Departamento de Clínica Médica

**Deteção da transmissão vertical do *S. mutans* e *S. sobrinus* e relação com o  
micro-ambiente bacteriano, índice de cárie e cuidados maternos**

Graziela de Almeida Prado e Piccino Marafiotti

Universidade Estadual Paulista - UNESP  
Faculdade de Medicina de Botucatu

**Detecção da transmissão vertical do *S. mutans* e *S. sobrinus* e relação com o micro-ambiente bacteriano, índice de cárie e cuidados maternos.**

**Graziela de Almeida Prado e Piccino Marafiotti**

Orientador: Profa. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini

Co-orientador: Profa. Dra. Nídia Alice Pinheiro

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor no Programa de Fisiopatologia em Clínica Médica; área de concentração: Fisiopatologia em Clínica Médica

**Botucatu-SP**

**2009**

Ficha Catalografica-Bibliotecaria Responsável: Eliane Borba

M298d Marafiotti, Graziela de Almeida Prado e Piccino

Detecção da transmissão vertical do *S. mutans* e *S. sobrinus* e relação com o micro-ambiente bacteriano, índice de cárie e cuidados maternos / Graziela de Almeida Prado e Piccino Marafiotti -- 2009.  
28 f.  
Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês M. C. Pardini.  
Tese (Doutorado em Fisiopatologia em Clínica Médica) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu - SP.  
1. Cárie dentária. 2. Placa dentária. 3. Saliva. 4. Streptococcus mutans. 5. Streptococcus sobrinus. 6. Transmissibilidade I. Pardini, Maria Inês M. C. II. Título

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Botucatu, agosto de 2009.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Sagrado Coração, Bauru.SP.

Protocolo: 0062/2004

Data: 16 de setembro de 2004

***"Tente progredir com simplicidade, permanecendo firme  
nas resoluções que você tomou."***

Padre Pio de Pietrelcina

# DEDICATÓRIA

***À DEUS, meu Pai querido, que sempre está ao meu lado e O qual tem sido responsável por tantas graças alcançadas.***

Ao meu marido, amor e amigo, Pedro Egidio, pessoa maravilhosa que Deus colocou em minha vida e escolheu para ser pai dos nossos filhos, minha eterna gratidão e carinho.

Aos meus filhos, meu coração, Pedro Egidio e João Pedro, pela graça de tê-los em minha vida, amo vocês. ***“Uma sábia vida de família representa, neste mundo, a imagem mais próxima do céu”***

Ao meu pai, Prof. Dr. Antonio Carlos Piccino, do qual segui a profissão, pelo exemplo de luta e dignidade.

A minha mãe, Gracita, pelo exemplo de mãe com a qual tive a felicidade de conhecer o verdadeiro amor de DEUS e por me fazer conhecer a graça e ternura da Mãe Maria.

A minha sogra e mãe, Cleide, que nos tem tanto amor, sempre demonstrando à nossa família, como viver com a paz de Jesus.

A minha irmã, amiga, Claudia, pelo incentivo e apoio ao meu trabalho e pela amizade, carinho e dedicação que tem por mim e por meus filhos.

Aos meus irmãos, Antonio Carlos e João Carlos o meu obrigada por saber que vocês estão sempre aí, com muito amor, ao meu lado.

As minhas cunhadas Maria Tereza, Andréia, Tereza e Lizandra e meus cunhados, Mirto Jr., David e Edson; e aos meus sobrinhos Camila, Ana Cândida, Mirto Neto, Antonio Carlos Neto, José Carlos, Ana Maria, Isabela, Ana Julia, João Francisco e Marina agradeço a alegria de ter uma família tão maravilhosa.

A minha querida prima-irmã Lia, nosso amor não precisa ser dito, é uma herança.

As minhas amigas-irmãs, Catherine, Regina e Solange, companheiras não só no exercício da docência no curso de Odontologia da Universidade do Sagrado Coração, mas na minha vida.

Aos pacientes, não só aqueles que compõem a amostragem deste estudo, mas todos, pois são o fim maior da nossa constante procura pelo saber.

*Agradeço sinceramente a minha orientadora  
Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini e  
minha co-orientadora, a Dra. Nidia Alice Pinheiro,  
profissionais de extrema competência, caráter e dedicação.  
Agradeço a confiança em mim depositada, todos os  
ensinamentos e as muitas oportunidades oferecidas.*

# AGRADECIMENTOS

*As Irmãs Apóstolas do Sagrado Coração de Jesus e ao corpo diretivo da Universidade, por todo respeito e dedicação especial a cada um dos docentes, alunos e funcionários da Universidade do Sagrado Coração.*

*Ao Dr. José Mauro Zanini, diretor técnico do Hemocentro, pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, pelo apoio a análise estatística e interpretação dos resultados deste estudo.*

*Ao Prof.Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado, um grande mestre.*

*A minha amiga Regina Célia, quero deixar aqui um agradecimento especial,*

*Ao meu amigo, Dr. Eduardo Bresciane, sempre tenho a certeza de que posso contar com você,*

*A Dra. Adriana Ferrasi, pelo apoio constante, amizade, sinceridade, ensinamentos, sempre presente durante o desenvolvimento do meu trabalho.*

*A amiga, Solange Braga Franzolin, minha irmã desde 1969, agradeço a oportunidade de podermos conviver durante o nosso curso e trabalho, além de acompanhar a sua alegria no apoio e assistência a todas as colegas.*

*A toda a turma do doutorado pela a amizade e compreensão nos momentos em que passamos juntos.*

*A todos os amigos da USC, Cecília, Ester, Leila, Dr. Casati, Izabel, Márcia, Marisa, Patrícia, Dr. Sylvio, Débora, Marcos, José Carlos, Lucirene, Padovan, Simone, Carolina, Sara, Leda, Tereza, Ana Daher, D. Alda, Solange Codato, Taísa e todos os colegas e funcionários, agradeço por tê-los ao meu lado.*

*Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, Adriana, Cristiane, Elisabete, Márcia, Camila, Denise, Chiara, Lucia, Marjorie, Priscila e Rejane, pela amizade e companheirismo sempre presentes.*

*As secretárias Cléo, Janice e Ana Maria Mengue, e, pela pronta disposição em sempre ajudar.*

*Aos membros da Divisão do Hemocentro, pela disponibilidade e prontidão para a realização deste estudo.*

*Aos membros da Clínica Médica, agradeço pela atenção e profissionalismo pelo qual administram o Programa de Pós-Graduação.*

*Aos meus alunos do Curso de Odontologia da Universidade do Sagrado Coração, estímulo constante para a busca do conhecimento.*

*A minha secretária, Tereza Braulino, que dedica carinho e atenção aos meus filhos e minha casa.*

*Aos funcionários da Universidade do Sagrado Coração que no desempenho de suas funções participam ativamente de nosso trabalho.*

*Aos funcionários da Pós-Graduação da Universidade Estadual Paulista, FMB, que no desempenho de suas funções estão sempre à disposição e com bastante entusiasmo, nos dedicam o seu tempo.*

***Obrigada!***

**Detecção da transmissão vertical do *S. mutans* e *S. sobrinus* e relação com o micro-ambiente bacteriano, índice de cárie e cuidados maternos.**

Autores:

Graziela de Almeida Prado e Piccino Marafiotti \*

Nidia Alice Pinheiro \*\*

Claudia de Almeida Prado Piccino Sgavioli \*

Solange de Oliveira Braga Franzolin \*

Maria Inês de Moura Campos Pardini \*\*\*

\* Universidade do Sagrado Coração, USC, Bauru, SP

\*\* Universidade Federal do ABC

\*\*\* Departamento de Clínica Médica e Hemocentro da Faculdade de Medicina- UNESP, Botucatu, SP.

- Coleta de dados realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro –Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP

## Resumo

*Introdução.* A cárie dentária pediátrica continua sendo uma doença significativa em países em desenvolvimento. A presença de microrganismos cariogênicos na saliva materna pode favorecer a contaminação de seu filho. O desenvolvimento das lesões é fortemente dependente do momento em que ocorreu a infecção; quando precoce, a prevalência de cárie é maior.

*Objetivos.* Detectar a transmissão vertical do *S. mutans* e *S. sobrinus* e relação com o micro ambiente bacteriano, índice de cárie e cuidados maternos.

*Material e Métodos.* Amostra: 60 crianças, ambos os gêneros, de um a três anos de idade e suas respectivas mães. Técnicas utilizadas: PCR e Nested-PCR. Índices de cárie: CPO-D e ceo. Instrumentos: exame clínico e questionário aplicado às mães. Registrou-se: ceo, CPO-D, higiene bucal, cuidados e hábitos de carinho.

*Resultados.* Houve concordância de ausência e de presença de *Streptococcus mutans* e *sobrinus* entre mães e filhos, com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), tanto na placa como na saliva; índices de cárie igual a zero somente em 38,33% das crianças e 10% das mães; maior frequência de respostas das mães para a questão sobre o não uso de fio dental, duas escovações diárias, visita ao dentista com intervalo de seis meses e prova do alimento do filho com a própria colher.

*Conclusão.* As técnicas PCR e Nested PCR se mostraram adequadas para a detecção de *Streptococcus*. Houve concordância dos resultados dos filhos e suas respectivas mães quanto à presença/ausência de microrganismos *S. sobrinus* e *S. mutans* na placa e saliva, sugerindo a transmissibilidade vertical. Detectou-se um menor índice de cárie dos filhos em relação às suas mães. O Índice de cárie das crianças foi superior ao esperado pela OMS para 2010 e os hábitos de higiene/carinhos relatados pelas mães eram inadequados para com seus filhos. Há a necessidade de implementar programas de Promoção de Saúde Bucal, principalmente nas populações menos informadas.

Palavras-chave: cárie dentária, placa dentária, saliva, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, transmissibilidade.

**Abstract:**

*Introduction:* Dental caries in children is still an expressive disease .The presence of cariogenic microorganisms on maternal saliva might favor contamination of their children. The development of caries lesions is strongly related to the time when infection takes place; the sooner, the higher the caries prevalence.

*Objectives:* To detect *S.mutans* and *S.sobrinus* vertical transmissibility and its relation with bacterial microenvironment, caries index and maternal care.

*Material and Methods:* Sample: composed of 60 children of both genders, aging from one to three years, with their respective mothers. Employed techniques: PCR and Nested-PCR. Caries indexes: DMFT and dmft. Instruments: clinical exam and questionnaires applied to mothers. Assessed: DMFT, dmft, oral hygiene, care and affection habits.

*Results:* There was a correlation between the presence or absence of *Streptococcus mutans* and *sobrinus* of mothers and respective children, being statistically different ( $P<0.05$ ) both on dental plaque and saliva. The caries index was equal to zero in 38.33% of children and 10% of mothers. Not flossing, tooth brushing twice a day, appointment with a dentist every 6 months and tasting their children's food with the same spoon were the answers more frequently observed.

*Conclusion:* PCR and Nested PCR techniques were adequate to detect *Streptococcus mutans* in saliva and dental plaque. The microorganisms' detection was similar, both in saliva and dental plaque, and a correlation on the results of children and their respective mothers regarding presence/absence of *S.sobrinus* and *S.mutans* on either dental plaque or saliva was observed, confirming vertical transmission. A lower caries index was observed in children in relation to their respective mothers, although being higher than the WHO 2010 guidelines. The hygiene/affection habits related by mother were

inadequate to their children. There is a necessity to implement programs to promote oral health, mainly in less oriented populations, like the one sampled in the present study.

Key words: dental caries, dental plaque, saliva, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, transmissibility

## **INTRODUÇÃO**

A cárie dentária é definida como doença infectocontagiosa que surge da interação de vários fatores, resultando na perda de estruturas mineralizadas do elemento dentário. Tais fatores são: dieta rica em carboidratos fermentáveis, susceptibilidade do hospedeiro e presença de microorganismos cariogênicos, atuando por tempo suficiente sobre a superfície dentária<sup>1</sup>. Além destes, apresentam-se também como fatores secundários: a saliva, presença de flúor e a própria higiene do indivíduo<sup>2</sup>.

Apesar do seu declínio, a cárie dentária ainda é uma das doenças mais prevalentes da atualidade, chegando a atingir 90% da população brasileira.

O índice de cárie CPO-D foi inicialmente descrito por KLEIN, PALMER, em 1937 e modificado a partir do manual sobre “Índice CPO” preparado pelo *Dental Health Center* em 1965. A contagem CPO-D de um indivíduo é dada pelo número total de dentes “D” com experiência de cárie, incluindo-se: dentes cariados “C” (não importando a extensão ou severidade da lesão), dentes restaurados “O” (a restauração/obturação indica atividade de cárie no passado), dentes perdidos “P” (extração motivada pela cárie dentária). O Índice CPO-D de um grupo de pessoas é dado pela média aritmética da soma de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados dividido pelo número das pessoas examinadas (KLEIN, PALMER, 1937)<sup>3</sup>. O índice CEO é utilizado para registrar a história de cárie na dentição decídua, onde o componente “c” representa dentes cariados, “e” dentes extraídos e “o” dentes obturados<sup>4</sup>.

Segundo dados apresentados pelo Ministério da Saúde no ano de 2003, no último levantamento epidemiológico para doença cárie realizado no país, foram detectados 27% das crianças brasileiras de 18-36 meses de idade, apresentando pelo menos um dente decíduo com experiência de cárie dentária, sendo que essa proporção aumenta para quase 60% das crianças com cinco anos de idade. Quanto à cárie dentária na dentição permanente, quase 70% das crianças brasileiras de 12 anos de idade e cerca de 90% dos adolescentes de 15 a 19 anos apresentam pelo menos um dente permanente com lesão<sup>5</sup>.

*Streptococcus* do grupo *mutans* são geralmente apontados como os principais agentes etiológicos de cáries dentárias. Neste grupo de

microrganismos estão incluídos sete espécies e oito sorotipos: *Streptococcus cricetus* (a), *S. rattus* (b), *S. mutans* (c, e, f), *S. ferus* (c), *S. macacae* (c), *S. sobrinus* (d, g) e *S. downei* (h), entre os quais o *S. mutans* e o *S. sobrinus* são predominantes entre as populações humanas. Como já demonstrado, pode existir associação entre *S. mutans* e *S. sobrinus* na ocorrência da doença cárie<sup>6, 7, 8</sup>. Estes microorganismos são capazes de aderir às superfícies dos dentes, formar a placa bacteriana, produzir grande quantidade de ácido, sobreviver e continuar processos metabólicos nestas condições (pH baixo), causar desmineralização da estrutura dentária.

Como a cárie dentária é causada por bactérias, por definição ela é uma doença infecciosa e também deve ser transmissível. Contudo, a cárie dentária não é resultado de infecção por patógeno exógeno, mas sim por microbiota nativa, diferindo de outras doenças infecciosas, principalmente porque as microbiotas nativas são transmitidas de mãe para filho. Há evidências que mostram que a bactéria cariogênica *Streptococcus mutans* é transmitida verticalmente (de mãe para filho) assim, a cárie dentária não é nem contagiosa e nem epidêmica como as doenças transmitidas horizontalmente (de infectado para o suscetível)<sup>9</sup>.

Thorild et al., 2002<sup>10</sup>, procuraram estabelecer a prevalência e a possível relação da colonização bucal por *Streptococcus* do grupo *mutans* em pares mãe-filho (crianças com 18 meses a três anos de idade), sustentando o

conceito de transmissão vertical, justificando medidas preventivas primárias de ação direta nas mães com altos níveis de colonização por essas bactérias.

A experiência de cáries de crianças é bem mais correlacionada com o histórico de suas mães do que de seus pais. Isto pode ser explicado, em parte, pelo fato de que geralmente as mães são responsáveis por alimentar seus filhos nos primeiros anos de vida. A mãe é a fonte mais provável de bactérias bucais (concordância em mais de 70% das vezes) à medida que lactente adquire seu próprio complemento de microbiota nativa ao longo de seu desenvolvimento. Embora os *Streptococcus mutans* não sejam detectados até o aparecimento dos dentes, outras bactérias bucais colonizam a superfícies da língua e mucosa bucal. É provável que a mãe transmita os microorganismos cariogênicos pelo contato com a saliva ou gotículas, que se alojariam em um reservatório até a irrupção dos dentes decíduos, onde se estabeleceriam na placa dentária<sup>9</sup>.

Para detectar a transmissibilidade vertical, faz-se necessário verificar a presença ou ausência de *Streptococcus* (concordância dos eventos) entre as mães e seus respectivos filhos, bem como o microambiente em que eles se encontram (saliva e/ou placa).

O objetivo deste trabalho foi detectar a transmissibilidade vertical do *Streptococcus mutans* (*S. mutans* e *S. sobrinus*), bem como a relação desta transmissibilidade com o microambiente bacteriano (saliva e placa dentária), número de dentes cariados na mãe e filho e cuidados da mãe para com o filho.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Foram analisadas 60 crianças, com idade de dois a cinco anos, de ambos os gêneros e suas respectivas mães, que utilizam os serviços da Clínica de Odontologia da Universidade do Sagrado Coração, Bauru, São Paulo, Brasil.

O exame clínico foi realizado em todos os participantes pela mesma operadora, para determinação do índice de cárie dentária, utilizando-se os critérios para diagnóstico de cárie propostos pela OMS<sup>4</sup>.

Definiu-se pela aplicação de questionário às mães, a fim de conhecer os hábitos intrafamiliar como o relacionamento mãe/filho no que se refere à manifestação de carinhos (beijo), atitudes durante a alimentação de seu filho (modo de experimentar e esfriar os alimentos), higiene bucal (número de escovações por dia e uso de fio dental), frequência da visita ao dentista.

A coleta das amostras foi feita friccionando hastes flexíveis com pontas de algodão estéril nas superfícies dos dentes molares e uma segunda haste foi embebida na saliva. Cada material biológico foi armazenado em tubo estéril distinto: um para placa dentária e outro para saliva e colocado em recipiente térmico resfriado para ser transportado ao Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Todos os participantes foram devidamente informados com relação à pesquisa e esclarecidos que esta não implicaria em riscos adicionais do seu tratamento. Não foram incluídos neste estudo pacientes que utilizaram antibioticoterapia nos três meses que antecederam a coleta.

O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (Parecer nº 0062/2004).

A extração e análise da qualidade do DNA foram realizadas a partir da saliva ou do raspado da placa dentária. O material estocado a -80°, devidamente etiquetado até o momento de sua utilização. A extração do DNA foi realizada utilizando o kit Wizard® Genomic (Promega), conform instruções do fabricante. A detecção da presença e qualidade do DNA genômico foi monitorada através da amplificação por PCR para o gene *GAPDH*.

Realizou-se a detecção de *S. mutans* e *S. sobrinus*, por Nested PCR\*, pela amplificação dos genes *16S Rna* por PCR<sup>11</sup>, utilizando primers universais 8UA e 1492R<sup>12</sup> e Taq DNA polimerase (Hot Star Taq Master Mix; Germany) de acordo com instruções do fabricante.

A segunda amplificação, Nested PCR, utilizou *primers* específicos. Esta PCR foi de 35 ciclos para ambos os genes bacterianos. Para *S. mutans* utilizou-se os *primers sm1* e *sm2* e para *S. sobrinus* o *SobF* e *SobR*<sup>13</sup>. O

produto amplificado nessa reação foi visualizado em gel de poliacrilamida não desnaturante 6%<sup>14</sup> e corado pelo nitrato de prata<sup>15; 1</sup>.

O perfil dos participantes segundo as respostas do questionário foi estabelecido pela distribuição de frequência dos dados, e estes apresentados em tabelas e gráficos. A relação entre *S. mutans* e *S. sobrinus* com o CPO-D e ceo foi avaliado pelo teste de Goodman para contrastes entre e dentro de populações multinomiais<sup>16,17</sup>. Foi aplicado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para a análise do número de microorganismo em relação à higiene da língua, uso de fio dental, número de escovação diária, data da última visita ao dentista, teste de temperatura do alimento, modo de esfriar o alimento e modo de beijar o filho<sup>18</sup>. Todas as discussões foram realizadas no nível de 5% de significância.

## **RESULTADOS**

### Micro-ambiente bacteriano

Uma primeira observação refere-se à presença do *S. mutans* e *S. sobrinus* na saliva e sua relação com a placa dentária da criança e dos adultos com o ceo e CPO-D, respectivamente. Foi observado que 31,67% das crianças e 46,67% do grupo formado pelas mães tinham índice de cárie igual ou maior que três, enquanto 38,33% das crianças e 10% dessas mulheres não

---

<sup>1</sup> O detalhamento metodológico encontra-se em anexo, na forma de Procedimento Operacional Padrão-POP.

apresentavam cárie. Em todas as situações detectou-se que um número maior de mães apresentou microorganismos em relação aos filhos. Todas as crianças e as mães que apresentaram maior índice de cárie possuíam *S. mutans* na saliva e apenas duas dessas mulheres adultas não o apresentavam na placa dentária. Esta situação mostrou diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ). As crianças positivas para *S. mutans* e *S. sobrinus* (com ou sem cárie) eram filhas de mães com componente cariado maior que o componente obturado; 38,33% das crianças não tinham cárie (Tab. 1).

Tabela 1. Relação de *S. mutans* e *S. sobrinus* na saliva e placa dentária com os índices ceo e CPO-D

	<i>S. mutans</i>						<i>S. sobrinus</i>						
	saliva			placa			saliva			placa			
	presente	ausente	total	presente	ausente	total	presente	ausente	total	presente	ausente	total	
ceo (criança)	0	13	10*	23	8*	15	23	3	20*	23	5	18**	23
	<3	12	6*	18	13*	5	18	12*	6	18	6	12*	18
	≥3	19**	0	19	19*	0	19	16**	3	19	15**	4	19
	<b>total</b>	<b>44</b>	<b>16</b>	<b>60</b>	<b>40</b>	<b>20</b>	<b>60</b>	<b>31</b>	<b>29</b>	<b>60</b>	<b>26</b>	<b>34</b>	<b>60</b>
CPO-D (adulto)	0	4	2*	6	3	3	6	3	3	6	0	6**	6
	<3	18#	8*	26	22#	4	26	14	12	26	16*	10	26
	≥3	28**	0	28	26#	2	28	22#	6	28	19**	9	28
	<b>total</b>	<b>50</b>	<b>10</b>	<b>60</b>	<b>51</b>	<b>9</b>	<b>60</b>	<b>39</b>	<b>21</b>	<b>60</b>	<b>35</b>	<b>25</b>	<b>60</b>

Teste de Goodman

\* comparação dos dados da coluna (vertical)

# comparação dos dados da linha (horizontal)

## Hábitos de higiene

A relação da presença do *S. mutans* e *S. sobrinus* no que se refere aos hábitos de higiene oral e tempo da última visita ao dentista, estão apresentados na Tabela 2. No questionário aplicado, 45% das mães responderam que escovavam a língua e 38,33% usavam o fio dental durante a higiene bucal de seus filhos, porém, mesmo nestas crianças predominou presença de *S. mutans* na saliva e placa ( $P < 0,05$ ). O número de escovações mais apontado foi duas vezes ao dia, com 43,33% das respostas das mães. A respeito do tempo da última visita ao cirurgião dentista, 51,67% das mães responderam que a fizeram há mais de seis meses.

Tabela 2. Distribuição do *S. mutans* e *S. sobrinus* na saliva e placa dentária dos filhos de acordo com sua higiene oral e última visita ao dentista, segundo respostas de suas mães

	<b>S. mutans</b>				<b>S. sobrinus</b>				
	Saliva		Placa		Saliva		Placa		
	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	
Higiene da língua	Não	22 <sup>#</sup>	11	18	15*	15	18	14	19
	Sim	22 <sup>#</sup>	5	22 <sup>**</sup>	5	16	11	12	15
Uso de fio dental	Não	28 <sup>**</sup>	9	25	12	20	17	15	22
	Sim	16	7	15	8	11	12	11	12
Número de escovações	1	11 <sup>#</sup>	3	11 <sup>#</sup>	3	8 <sup>#</sup>	6	5	9
	2	17 <sup>#</sup>	9	14 <sup>#</sup>	12*	12	14*	11	15*
	3	9 <sup>#</sup>	2	7 <sup>#</sup>	4	4	7	4	7
	4 ou +	7 <sup>#</sup>	2	8 <sup>#</sup>	1	7	2	6	3
Tempo da última visita ao cirurgião dentista	3 meses	15 <sup>**</sup>	3	15 <sup>**</sup>	4	14	10	7	11
	6 meses	22 <sup>**</sup>	9	22 <sup>**</sup>	12	19	16	10	21 <sup>**</sup>
	1 ano ou +	5	3	5	4	4	3	6	2
	Não sabe	2	1	2	0	3	0	3	0

Teste de Mann-Whitney

\* comparação dos dados da coluna (vertical)

# comparação dos dados da linha (horizontal)

## Cuidados maternos

A Tabela 3 apresenta a presença de *S. mutans* e *S. sobrinus* de acordo com os cuidados intrafamiliar, modo da mãe e alimentar e beijar seu filho. Foi observado que a maioria das mães prova o alimento na colher do próprio filho, quando querem testar a temperatura (de 35% a 48,33%). Quanto a esfriar o alimento, a maioria das mães aguardam que esfrie (38,33% a 60%) sem assoprar. Cinco das 60 mães responderam que beijavam seus filhos na boca e todas elas tinham presença de *S. mutans* e *S. sobrinus* na saliva e/ou placa.

Tabela 3. Distribuição do *S. mutans* e *S. sobrinus* na saliva e placa dentária das mães de acordo com hábitos de carinho e cuidados, segundo suas respostas

	<u><i>S. mutans</i></u>						<u><i>S. sobrinus</i></u>		
	Saliva		Placa		Saliva		Placa		
	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	
<b>Teste da temperatura do alimento</b>									
Aguardam	16 <sup>#</sup>	2	15 <sup>#</sup>	3	13	5	13 <sup>*#</sup>	5	
colher diferente	7 <sup>#</sup>	1	7 <sup>#</sup>	1	2	6	1	7 <sup>*#</sup>	
própria colher	27 <sup>#</sup>	7	29 <sup>#</sup>	5	24	10	21 <sup>*</sup>	13	
<b>Modo de esfriar o alimento</b>									
aguardam	32 <sup>#</sup>	7	36	3	24	15	23	16	
abanam	8 <sup>#</sup>	2	7	3	7	3	6	4	
assopram	10 <sup>#</sup>	1	8	3	8	3	6	5	
<b>Modo de beijar o filho</b>									
face	24 <sup>#</sup>	4	23 <sup>*#</sup>	5 <sup>*</sup>	16	12	14	14	
mãos e face	21 <sup>*#</sup>	6 <sup>*</sup>	23 <sup>#</sup>	4	18	9	18	9	
boca	5 <sup>*#</sup>	0 <sup>*</sup>	5 <sup>*#</sup>	0 <sup>*</sup>	5	0	3	2	

Teste de Mann-Whitney

\* comparação dos dados da coluna (vertical)

# comparação dos dados da linha (horizontal)

## Transmissibilidade vertical

A análise de transmissibilidade registrou grande concordância nas respostas dos pares (filho e respectiva mãe) com diferença estatisticamente significativa em relação a não concordância em todas as situações. O *S. mutans* estava presente na saliva em 42 pares e ausente em 8 pares (83,33%,  $P < 0,05$ ); na placa, presente em 38 pares e ausente em 7 pares (75%,  $P < 0,05$ ). Quanto ao *S. sobrinus* detectou-se presença na saliva em 29 pares, ausência em 19 pares (80%,  $P < 0,05$ ); presença na placa em 23 pares, ausência na placa em 22 pares (75%,  $P < 0,05$ ) (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição dos filhos e respectivas mães de acordo com a ausência ou presença de *S. mutans* e *S. sobrinus* na saliva e placa dentária para a avaliação da concordância e discordância dos eventos

		<b><i>S. mutans</i> na saliva</b>			<b><i>S. mutans</i> na placa</b>		
<b>Mãe</b>	<b>Filho</b>	presente	ausente	total	presente	ausente	total
	presente		42*#	8	50	38*#	13
ausente		2	8*#	10	2	7*#	9
total		44	16	60	40	20	60

  

		<b><i>S. sobrinus</i> na saliva</b>			<b><i>S. sobrinus</i> na placa</b>		
<b>Mãe</b>	<b>Filho</b>	presente	ausente	total	presente	ausente	total
	presente		29*#	10	39	23*#	12
ausente		2	19*#	21	3	22*#	25
total		31	29	60	26	34	60

Teste de Goodman

\* comparação dos dados da coluna (vertical)

# comparação dos dados da linha (horizontal)

## Índices de cárie

A Tabela 5 relaciona os componentes do CPO-D: dentes cariados (C) e dentes obturados (O) das mães, com o índice ceo dos seus respectivos filhos. Todas as mães com CPO-D igual a zero tinham filhos com ceo também zero.

Tabela 5. Relação CPO-D quanto aos componentes C e O das mães, com o índice ceo dos seus respectivos filhos

Filhos ceo	Mães		CPO-D				Total
	0	<3		≥3			
		C>O	C<O	C>O	C<O		
0	6	3 <sup>#</sup>	12	-	2	23	
<3	-	11 <sup>#</sup>	-	2 <sup>#</sup>	5	18	
≥3	-	-	-	19 <sup>#</sup>	-	19	
Total	6	14	12	21	7	60	

Teste Qui-quadrado

<sup>#</sup> comparação dos dados da linha (horizontal)

## DISCUSSÃO

No presente estudo, objetivou-se identificar a presença do *S. mutans* e do *S. sobrinus* na saliva e placa dentária de crianças e suas mães, para avaliar a transmissibilidade vertical e a relação com o micro ambiente bacteriano, índice de cárie e cuidados maternos. Para isso, foram utilizadas técnicas de biologia molecular como *PCR* e *Nested PCR*, buscando elucidar aspectos dos fenômenos relacionados à transmissibilidade da doença, visto estas técnicas oferecerem a sensibilidade e especificidade necessárias o que já foi descrito por Loyola, Rodrigues<sup>19</sup>.

A proporção de crianças que possuem o *S. mutans* aumenta com a idade. Os primeiros estudos sugeriram que a presença dos dentes era necessária para que acontecesse a colonização do *S. mutans*, por volta dos 16 meses de idade. Outros trabalhos relatam que esta colonização ocorre em 25% das crianças antes da irrupção dos dentes, já aos três meses de idade<sup>20</sup>.

A idade das crianças examinadas na presente pesquisa foi de dois a cinco anos, sendo que 40 delas apresentavam *S. mutans* e 26 *S. sobrinus*, em média; apenas 38,33% das crianças eram livres de cárie. A Organização Mundial de Saúde estipulou como meta para 2010 que 90% das crianças entre cinco e seis anos estejam livre de cáries<sup>20</sup>.

Um dos melhores indicadores do desenvolvimento e do risco de cárie dentária é a presença de *S. mutans*. Em crianças pequenas, um fator chave é

o tempo de colonização por bactérias cariogênicas para avaliar o momento ideal para implantação de medidas preventivas<sup>22</sup>. Este conceito é confirmado por Alves<sup>23</sup>, quando afirma que conhecer a aquisição e transmissão da microbiota cariogênica permite uma medida mais racional no controle da cárie dental, já que se pode estabelecer o período crítico de infecção primária e uma abordagem terapêutica seria eficaz em tempo precoce para inibi-la.

Para Zickert<sup>24</sup>, Fujiwara et al.<sup>25</sup>, Gomes<sup>26</sup>, e Schaecken<sup>27</sup> a doença cárie pode ser atribuída a diversos fatores como o sócio-econômico, ambiental e educacional, principalmente considerando o acesso às informações e aprendizagem sobre a correta higiene e fisioterapia oral. No presente estudo, em relação ao hábito de higiene da língua e uso do fio dental detectou-se que a distribuição dos microorganismos foi casual.

A maioria das mães informou que escovavam os dentes de seus filhos duas vezes ao dia, que coincidiu com o número maior de crianças sem microorganismos (*S. mutans* e *S. sobrinus*) nos locais considerados: saliva e placa dentária.

Este dado corrobora as orientações feitas pelos Cirurgiões Dentistas que sugerem que as mães façam quatro escovações por dia em seus filhos, após as principais refeições. Porém, consideram que pelo menos duas escovações diárias sejam necessárias e indispensáveis para manter o ambiente bucal higienizado, pois este ato mecânico é capaz de desorganizar a placa dentária interrompendo a instalação e organização da placa bacteriana cariogênica<sup>28</sup>. A

motivação e a educação em higiene bucal constituem a base para a Saúde Bucal. O trabalho de Promoção de Saúde deve ser priorizado principalmente em grupos populacionais com menor acesso à assistência odontológica, condição apresentada em países subdesenvolvidos, sendo que a baixa condição sócio-econômica e deficiência de educação e informação da população podem ser um agravante direto para o aumento da prevalência da doença cárie<sup>29</sup>.

A colonização da cavidade bucal geralmente resulta da transmissão de microorganismos pela pessoa que cuida da criança, geralmente a mãe. O modo exato de transmissão é desconhecido, mas compartilhar alimentos e utensílios pode ser o mecanismo primário<sup>22</sup>. Köhler e Andréen<sup>30</sup> concluem que contatos salivares freqüentes de mães com altos níveis salivares de *S. mutans* favorece sua transmissão. Neste estudo detectou-se que, em média, 56,66% das mães experimentavam o alimento na própria colher do filho, e destas, 42,06% apresentavam microorganismos; 65% das mães informaram que esperavam a comida do filho esfriar, em vez de assoprá-la e somente 8,33% beijavam o filho na boca

Em média, 47 dos 60 pares (mãe-filho) apresentaram concordância para a presença ou ausência de *Streptococcus mutans* (*S. mutans* e *S. sobrinus*) na placa e na saliva, resultado estatisticamente significativo quando comparados aos 13 pares sem concordância.

Chama a atenção o índice de cárie ceo e CPO-D maior que três, verificado em 28,33% das crianças e 39,58% das mães (média de *S. mutans* e *S. sobrinus*, na saliva e placa dentária).

Os componentes do índice CPO-D das mães, cariados (C) e obturados (O), foi identificado para analisar o efeito das lesões expostas nas condições bucais de seus respectivos filhos. Neste trabalho, a relação mãe/filho mostrou que quanto mais lesões expostas nas mães, maior o índice ceo dos filhos. Isto sugere que investindo na saúde bucal das mães, promove-se a saúde bucal dos respectivos filhos.

Observou-se que a presença de dentes cariados aumenta, o ceo também aumenta. As mães com maior número de dentes obturados (restaurados) protegeram seus filhos da lesão. Entretanto, quando o número de dentes cariados (lesões de cárie expostas) era maior do que os obturados, seus filhos tinham ceo maior. Todos os resultados apresentados mostraram diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

Nesta análise, torna-se visível a necessidade de democratizar o acesso à tecnologia para alcançar a atenção integral à saúde, em todos os níveis de complexidade, intensificando medidas de promoção da saúde, por meio de ações básicas.

Em resumo, o presente trabalho evidenciou que as técnicas *PCR* e *Nested PCR* se mostraram adequadas para a detecção de *Streptococcus*

*mutans* na saliva e placa dentária, a presença de microorganismo se mostrou similar na saliva e placa dentária e houve concordância dos resultados dos filhos e suas respectivas mães quanto à presença/ausência de microrganismos *S.sobrinus* e *S.mutans* na placa e saliva, confirmando a transmissibilidade vertical. Detectou-se um menor índice de cárie dos filhos em relação às suas mães, o índice de cárie das crianças foi superior ao esperado pela OMS para 2010 e os hábitos de higiene/carinhos relatados pelas mães eram inadequados para com seus filhos. Há a necessidade de implementar programas de Promoção de Saúde Bucal, principalmente nas populações menos informadas, como a que amostrou esta pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. *Archs Oral Biol* 1960;1:304-20.
2. Bratthall D. Selection for prevention of high caries risk groups. *J Dent Res* 1980; 59 (special issue part II):2178-82.
3. Klein H, Palmer CE. Dental caries in American Indian children. *Public Health Bull* 1937;239:1-53.
4. World Health Organization. *Oral Health Surveys, Basics Methods*. 4th Ed. Geneva; 1997.
5. Ministério Da Saúde, Projeto SB Brasil 2003: Condições de saúde bucal da população Brasileira 2002-2003: resultados principais. Secretária de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. 2002.
6. Stabholz A, Mann J, Sela M, Schurr D, Steinberg D, Shapira J. Caries experience, periodontal treatment needs, salivary pH, and *Streptococcus mutans* counts in a preadolescent Down syndrome population. *Spec Care Dentist* 1991;11: 203-8.
7. Lindquist, B.; Emilson, C. G. Dental localization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human harboring both species. *Caries Res*, v.25, p.146-152, 1991.
8. Höfling JF et al. Presença de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* em escolares de diferentes classes sócio-econômicas e sua

- relação com a atividade cariogênica dessas populações. Rev. Odontol Univ São Paulo;1999;13:173-80,
9. Li Y, Caufield PW. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. J Dent Res 1995; 74: 681-5.
  10. Thorild I, Lindau-Jonson B, Twetman S. Prevalence of salivary Streptococcus mutans in mothers and their preschool children. Int J Paediatr Dent 2002;12:2-7.
  11. Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Kawada M, Oho T, Koga T. Development of a 5' nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus. J Clin Microbiol 2003;41:4438-41
  12. Sato T, Hu JP, Matsuyama J, Takahashi N. Rapid identification of cariogenic bacteria by 16S rRNA genes PCR-RFLP analysis. Cariology Today 2001;2:8-13.
  13. Rupf S, Merte K, Eschrich K, Stoßner L, Kneist S. Peroxidase reaction as a parameter for discrimination of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus. Caries Research 2001;35:258-64.
  14. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001. 2344 p.

15. Sanguinetti CJ, Dias-Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994;17:914-21.
16. Goodman LA. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Annals of mathematical statistics* 1964;35:716-725.
17. Goodman LA. On Simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics* 1965; 7:247-254.
18. Norman, GR, Streiner DL. *Bioestatistics the bare essentials*. Mosby Year Book, S't. Louis; 1994. 260p.
19. Loyola-Rodriguez JP, Martinez-Martinez RE, Flores-Ferreira BI, Patiño-Marin N, Alpuche-Solis AG, Reyes-Macias JF. Distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva of Mexican preschool caries-free and caries-active children by microbial and molecular (PCR) assays. *J Clin Pediatr Dent*. 2008;32:121-6.
20. Wan AK, Seow WK, Purdie DM, Bird PS, Walsh LJ, Tudehope DI. A longitudinal study of *Streptococcus mutans* colonization in infants after tooth eruption. *J Dent Res* 2003; 82:504-8.
21. World Health Organization. *The world oral health report 2003*. Geneva: WHO, 2003.

22. Tinanoff N, Kanellis MJ, Vargas CM. Current understanding of the epidemiology, mechanisms, and prevention of dental caries in preschool children. *Pediatric Dent* 2002;24:543-51.
23. Alves AC. Infecção por *Streptococcus* "mutans": variável importante para a determinação do risco à atividade cariogênica. *Rev Bras Odont* 1997;54:288-92.
24. Zickert I, Emilson CG, Krasse BO. Correlation of level and duration of *S. mutans* infection with incidence of dental caries. *Infect Immun* 1983;39:198-205.
25. Fujiwara T, Sasada E, Mima N, Ooshima J. Caries prevalence and salivary *mutans streptococci* in 0-2 year-old children of Japan. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991;19:151-4.
26. Gomes Filho, I. S. et al. Avaliação de um programa preventivo de saúde bucal em pré-escolares. *Revista Odonto Ciência, Porto Alegre*, n.27, p.221-233, 1999. Gomes
27. Schaeken MJ, Creugers TJ, Van der Hoeven JS. Relationship between dental plaque indices and bacteria in dental plaque and those in saliva. *J Dent Res* 1987;66:1499-502.
28. Rølla G, Öggård B, Cruz A R. Topical application of fluorides on teeth. New concepts of mechanism of interaction. *J Clin Periodontol* 1993;20:105-108.

29.Ong G. Periodontal disease and tooth loss. Int Dent J 1998;48(suppl 1):233-48.

30.Köhler, B.; Andréen, I. Influence of caries-preventive measures in mothers on cariogenic bacteria and caries experience in their children. Arch Oral Biol, v. 39, n. 10, p. 907-911, 1994

## **PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO-POP**

Para detecção de *S. mutans* e *S. sobrinus* na saliva e placa dentária.

Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro- Faculdade de Medicina,  
UNESP-Botucatu, SP.

**Autora:** Graziela de Almeida Prado e Piccino Marafiotti

**FICHA TÉCNICA nº 1**

**Material utilizado para extração de DNA**

Saliva e Placa Dentaria (ficha técnica nº 2 ).

## FICHA TÉCNICA n° 2

### Coleta de saliva e placa dentária escolha do método de extração de DNA

- Coletar 3 mL de saliva de cada paciente em tubo estéril
- Coletar placa dentária friccionando pontas de algodão estéril nas superfícies dos dentes molares e inserir o material em um tubo estéril.
- Manter o tubo a 4°C até a manipulação da amostra.

#### **Escolha do método para obtenção de DNA:**

- A extração do DNA das amostras deverá realizada utilizando o kit Wizard® Genomic Promega de acordo com o protocolo e instruções do fabricante. (ficha técnica n°3)

## FICHA TÉCNICA nº 3

### Extração do DNA-Kit Wizard® Genomic(Promega)

- 1) Adicione 600 µl de solução de Lise (solução1) em um tubo de centrífuga de 15 ml
  - 2) Incube o lisado a 65° C por 10 minutos (aplique um vórtex a cada 5 minutos)
  - 3) Adicione 3µl da solução RNASE, misture 2-5 vezes ( por inversão do tubo) e deixe 15 minutos a 37° C
  - 4) Resfrie a amostra a temperatura ambiente por 5 minutos
  - 5) Com a amostra a temperatura ambiente, adicione 200µl de Solução de precipitação de Proteínas (solução 3) e aplique o vórtex vigorosamente a uma alta velocidade por 20 segundos. Resfrie a amostra em gelo por 5 minutos
  - 6) Centrifugue por 10 minutos a 11.500 RPM. A proteína precipitada irá formar um “pellet” branco
  - 7) Cuidadosamente remova o sobrenadante (que contém O DNA) deixando o “pellet” de proteína.
  - 8) Transfira o sobrenadante para um tubo (1,5ml) limpo contendo 600µl de Isopropanol a temperatura ambiente
  - 9) Misture gentilmente por inversão até que a longa fita de DNA torne-se uma massa visível
  - 10) Agite no vortex rapidamente e Centrifugue por 10 minutos a 11.500 RPM a temperatura ambiente. O DNA será visto como um pequeno “pellet”. CUIDADOSAMENTE decante o sobrenadante
  - 11) Inverta o tubo em um papel absorvente limpo e seque o “pellet” por 30 minutos a temperatura ambiente
  - 12) Adicione 50µl de solução de reidratação de DNA (Solução 4) ,agite no vórtex 3 vezes, centrifugue por 5 minutos e incube por 1 hora à 65° C OU estoque o DNA A 4°C e NO DIA SEGUINTE: agite no vórtex e centrifugue por 2 minutos. Depois volte para 65°C por 1 H.
-

- 13) Centrifugue por 1 minuto
- 14) PCR (ficha técnica nº4)
- 15) Guardar as “AMOSTRAS/DNA” a  $-80^{\circ}\text{C}$

**FICHA TÉCNICA nº4**

**PCR para Detecção do gene *GAPDH***

**Primeira etapa :** A presença e qualidade do DNA genômico será monitorada através da amplificação por PCR (Reação de Polimerização em Cadeia) para o gene *GAPDH*

Reação	Quantidades	Mix x ____	[Final]
Água	18,05µl	234,65µl	-
Tampão (10x)	2,5µl	32,50µl	1x
dNTP (10 mM)	0,5µl	6,50µl	0,2mM
Mg (50 mM)	0,75µl	9,75µl	1,5mM
Primer F (20uM)	0,5µl	6,5µl	0,4uM
Primer R (20uM)	0,5µl	6,5µl	0,4uM
Enzima:	0,4µl	2,6µl	1,0U
DNA	2,0µl	µl	ng
Volume Final	25,0 µl	µl	

**Após o preparo colocar as amostra em termociclador com a seguinte ciclagem:**

Ciclagem			
Temperaturas	hh	min	seg
94 °C		04	
94 °C			30
59 °C			45
72 °C			45
72 °C		06	

} 35 ciclos

- Manter as amostras amplificadas a -20°C até que seja feita a visualização das bandas em gel de poliacrilamida descrito na ficha técnica nº 5.
- Oligonucleotídeos iniciadores na ficha técnica número 13.

## FICHA TÉCNICA n°5

### Visualização da PCR para *GAPDH,8UA,Sm1/Sm2, SobF/SobR*

<b>VISUALIZAÇÃO DA PCR</b>	DATA: PCR :	RESPONSÁVEL:
GENE: <b><i>GAPDH</i></b>	Tamanho do Produto: <b>220 pb</b>	
(X) Gel poliacrilamida 6,0 % (ficha técnica n°9)		Marcador: 5,0µl
<u>Tampão de Corrida:</u>		Azul: 2,0µl
(X) TEB 1,0X (ficha técnica n°10)		Amostra: 5,0µl
		Voltagem: 100V
		Tempo: 40 min
<b>VISUALIZAÇÃO DA PCR</b>	DATA: PCR :	RESPONSÁVEL:
GENE: <b><i>8UA</i></b>	Tamanho do Produto: <b>1505 pb</b>	
(X) Gel poliacrilamida 6,0 % (ficha técnica n°9)		Marcador: 5,0µl
<u>Tampão de Corrida:</u>		Azul: 2,0µl
(X) TEB 1,0X (ficha técnica n°10)		Amostra: 5,0µl
		Voltagem: 100V
		Tempo: 60 min
<b>VISUALIZAÇÃO DA PCR</b>	DATA: PCR :	RESPONSÁVEL:
GENE: <b><i>SM1/SM2</i></b>	Tamanho do Produto: <b>282 pb</b>	
(X) Gel poliacrilamida 6,0 % (ficha técnica n°9)		Marcador: 5,0µl
<u>Tampão de Corrida:</u>		Azul: 2,0µl
(X) TEB 1,0X (ficha técnica n°10)		Amostra: 5,0µl
		Voltagem: 100V
		Tempo: 55 min
<b>VISUALIZAÇÃO DA PCR</b>	DATA: PCR :	RESPONSÁVEL:
GENE: <b><i>sobrinus</i></b>	Tamanho do Produto: <b>546 pb</b>	
(X) Gel poliacrilamida 6,0 % (ficha técnica n°9)		Marcador: 5,0µl
<u>Tampão de Corrida:</u>		Azul: 2,0µl
(X) TEB 1,0X (ficha técnica n°10)		Amostra: 5,0µl
		Voltagem: 100V
		Tempo: 60 min

---

FICHA TÉCNICA nº6

PCR para Detecção do gene 8UA

Gene (Primers): 8UA		Comprimento:1505 pb		Eletrof.: / /	
Reação	Quantidades	Mix x 70	[Final]		
Água	16,7µl	167,0µl	-		
Tampão A	1,5µl	15,0µl	1x		
Tampão B	1,5 µl	35,0µl	0,2mM		
dNTP (10 mM)	0,5 µl	5,0µl	1,5mM		
Primer F (20uM)	0,4 µl	4,0µl	0,4uM		
Primer R (20uM)	0,4 µl	4,0µl	0,4uM		
Enzima: <b>Elongase</b>	<b>1,0µl</b>	10,0µl	1,0U		
DNA	<b>1,0 µl</b>	--- µl	ng		
Volume Final	25,0 µl	240,0µl			

Temperaturas	mm	ss
94 °C	03	
94 °C	01	
64°C	01	
72°C	02	
72 °C	07	

} 35 ciclos

- Correr 45 minutos na acrilamida (ficha técnica nº 9).
- Oligonucleotídeos iniciadores (ficha técnica nº 13).

FICHA TÉCNICA nº7

PCR para Detecção do gene *Sm1/Sm2*

Gene (Primers):Sm1/Sm2		Comprimento:282 pb		Eletrof.: / /	
Reação	Quantidades	Mix x 70	[Final]		
Água	19,05 µl	167,0µl	-		
Tampão (10x)	2,5 µl	15,0µl	1x		
dNTP (10 mM)	0,5 µl	35,0µl	0,2mM		
Mg ( 25 mM)(Gold)	1,5 µl	5,0µl	1,5mM		
Primer F (20uM)	0,5 µl	4,0µl	0,4uM		
Primer R (20uM)	0,5 µl	4,0µl	0,4uM		
Enzima: <b>GOLD</b>	0,2µl	10,0µl	1,0U		
DNA	1,0 µl	--- µl	ng		
Volume Final	25,0 µl	240,0µl			

Temperaturas	mm	ss
94 °C	03	
94 °C	01	
64°C	01	
72°C	02	
72 °C	07	

} 30 ciclos

- Correr 60 minutos na acrilamida (ficha técnica nº 9)
- Oligonucleotídeos iniciadores (ficha técnica nº 13)

**FICHA TÉCNICA n°8**

**PCR para Detecção do gene *SobF/SobR***

Gene (Primers): <i>SobF/SobR</i>	<b>Comprimento:546pb</b>	Eletrof.: / /
----------------------------------	--------------------------	---------------

Reação	Quantidades	Mix x 70	[Final]	
Água	16,7µl	167,0µl	-	
Tampão A	1,5µl	15,0µl	1x	
Tampão B	1,5 µl	35,0µl	0,2mM	
dNTP (10 mM)	0,5 µl	5,0µl	1,5mM	
Primer F (20uM)	0,4 µl	4,0µl	0,4uM	
Primer R (20uM)	0,4 µl	4,0µl	0,4uM	
Enzima: <b>Elongase</b>	<b>1,0µl</b>	10,0µl	1,0U	
DNA	<b>1,0 µl</b>	--- µl	ng	
Volume Final	25,0 µl	240,0µl		

Temperaturas	min	seg
94 °C		30
94 °C		30
58 °C		30
68°C	02	
68 °C	07	

} **35 ciclos**

- Correr 60 minutos na acrilamida (ficha técnica n° 9)
- Oligonucleotídeos iniciadores (ficha técnica n° 13)

## FICHA TÉCNICA n°9

### ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 5,0 e 7,0 % EM TEB 1X\*

- Preparar 30 mL de solução, suficiente para **6 géis de poliacrilamida 5,0%**:
  - 23,2 mL de água Milli-Q;
  - 3,0 mL de TEB 10X (em estoque - ficha técnica n°13 );
  - 3,8 mL de bis-acrilamida 40% (em estoque - ficha técnica n°13 );
- Preparar 30 mL de solução, suficiente para **6 géis de poliacrilamida 7,0%**:
  - 21,8 mL de água Milli-Q;
  - 3,0 mL de TEB 10X (em estoque - ficha técnica n°13 );
  - 5,2 mL de bis-acrilamida 40% (em estoque - ficha técnica n°13 );

**Obs:** guardar a 4°C as misturas que não forem usadas

- Não demorar para aplicar os géis nas placas previamente limpas e montadas, colocar os pentes e aguardar a polimerização total (cerca de 2 horas em temperatura ambiente ou 30 minutos em estufas 37°C);
- Aplicar as amostras nos poços (2µL de “bluejuice” Gibco/BRL® 5X com 10 µL do produto amplificado. No primeiro e último poço colocar 2 µL de “bluejuice” Gibco/BRL® 5X com 1µL de peso molecular);
- Correr a 70V e 400mA por 60 minutos com tampão TEB 1X (ficha técnica n°13);

Ao fim da corrida, corar o gel em solução de prata

---

\* Modificada da 2ª edição do POP/BPL - Biologia Molecular

---

## FICHA TÉCNICA nº10

### PREPARO DE SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE\*

#### **TEB 10X (Tampão para corrida da eletroforese e preparo do gel)**

- Tris.....27g
- EDTA.....25mL de solução 0,2M
- Ácido Bórico.....13,75g
- Água Mili-Q.....qsp250mL

Acertar o pH em 8,0

AUTOCLAVAR

Estocar a 4°C

#### **TEB 1X (Tampão para corrida da eletroforese e preparo do gel)**

Para prepara 500mL:

- 50mL de TEB 10X
- Água Milli-Q qsp 500mL

#### **BIS ACRILAMIDA 40%**

- 38g de acrilamida (utilizar máscara na pesagem)
- 2g de N,N'metilenobisacrilamida

Água Milli-Q qsp 100mL

Estocar a 4°C

• Modificada da 2ª edição do POP/BPL - Biologia Molecular

---

## FICHA TÉCNICA nº11

### SOLUÇÃO DE PRATA, FIXADORA E REVELADORA PARA VISUALIZAÇÃO DO GEL

#### **Solução de PRATA, CORANTE:**

- Pesar: 0,3 g DE NITRATO DE PRATA
- Colocar água Mili-Q +/- 50 ml para diluir
- Tira o gel do fixador e voltar a solução de prata +/- 10 minutos no agitador. Após o preparo da reação

#### **Preparo de 300ml:**

- 0,6g nitrato de prata
- 300ml água mili-Q

#### **REVELADORA**

- NaOH 3%
- Água mili-Q
- Formaldeído\*

**\* Acrescentar somente na hora de uso.**

#### **Preparo de 300ml:**

- 9,0g NaOH
- 300ml água mili-Q
- 1,0ml de formaldeído para cada 300ml de solução\*

#### **FIXADORA:**

- - Etanol 10%
- - Ácido Acético 0,5%
- Água mili-Q (895 ml - destilada e deionizada)

#### **Preparo de 300ml:**

- 30ml etanol 100%
  - 1,5ml ácido acético
  - 268,5ml água mili-Q
-

## FICHA TÉCNICA nº12

### Coloração do gel de Poliacrilamida com solução de prata

#### **Execução:**

- Fixar o gel por 5 minutos, sob agitação suave, em 150 ml de solução fixadora;
  - Remover a solução fixadora e reservá-la;
  - Colocar o gel em 150 ml de solução corante e deixar em agitação suave por 10 minutos. Desprezar a solução corante e enxaguar o gel 2 vezes em água mili-Q;
  - Acrescentar sobre o gel 150 ml de solução reveladora e deixar por aproximadamente 10 minutos;
  - Após o aparecimento das bandas, o gel é retornado à solução fixadora, onde pode permanecer até a secagem, que poderá ser realizada entre duas folhas de papel celofane incolor.
-

**FICHA TÉCNICA nº13**

**Oligonucleotídeos iniciadores, tamanho da seqüência  
a serem amplificados e referências**

PCR para	Oligonucleotídeos iniciadores (5`-3`)	Tamanho (pb)	Referências
<i>GAPDH</i>	CTT-AAG-GAA-ATG-CCC-CAT-TAC- CCA-TGC-TTA-ACA-AGA-CCA	196	Bertina et al,1994
<i>8UA</i>	AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG	1505	Sato et al, 1997
<i>149R</i>	TAC-GGG-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T		Sato et al,1997
<i>Sm1</i>	GGT-CAG-GAA-AGT-CTG-GAG-TAA- AAG-GCT-A	282	Rupf et al,2001
<i>Sm2</i>	GCG-TTA-GCT-CCG-GCA-CTA-AGC-C	282	Ruft et al,2001
<i>Soba</i>	CGG-ACT-TGC-TCC-AGT-GTT-ACT-AA	546	Ruft et al,2001
<i>SobR</i>	GCC-TTT-AAC-TTC-AGA-CTT-AC	546	Ruft et al,2001

---