

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CÁSSIO VICENTE PEREIRA

SUPRESSÃO E RECOLONIZAÇÃO DA PLACA BACTERIANA *IN*
***VITRO* POR *S. mutans* E *S. sobrinus* E SEU SIGNIFICADO EM**
RELAÇÃO À CÁRIE DENTÁRIA

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Biologia e Patologia Buco-Dental.

PIRACICABA – 2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

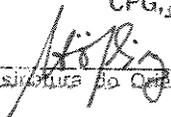
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CÁSSIO VICENTE PEREIRA

SUPRESSÃO E RECOLONIZAÇÃO DA PLACA BACTERIANA *IN VITRO* POR *S. mutans* E *S. sobrinus* E SEU SIGNIFICADO EM
RELAÇÃO À CÁRIE DENTÁRIA

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83

CPG, 20/02/02


Assinatura do Orientador

Tese apresentada a Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Doutor em
Biologia e Patologia Buco-Dental.

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling

Banca examinadora:

Profa. Dra. Izabel Yoko Ito

Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer

Profa. Dra. Denise M. Palomari Spolidorio

Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

PIRACICABA – 2001

UNIDADE	BE
Nº CHAMADA T/UNICAMP	P414A
	48871
	16.837102
PREÇO	R\$41,00
DATA	08/05/02
Nº CPD	

CM00167148-9

113 ID 239267

Ficha Catalográfica

P414s Pereira, Cássio Vicente.
 Supressão e recolonização da placa bacteriana *in vitro* por
S. mutans e *S. sobrinus* e seu significado em relação à cárie
 dentária. / Cássio Vicente Pereira. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2001.
 xiv, 86f. : il.

Orientador : Prof. Dr. José Francisco Höfling.
 Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
 Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Cáries dentárias. 2. Microbiologia. 3. Placas dentárias. I.
 Höfling, José Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da
 Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 19 de Outubro de 2001, considerou o candidato CÁSSIO VICENTE PEREIRA aprovado.

1. Prof. Dr. JOSE FRANCISCO HOFLING

2. Profa. Dra. DENISE MADALENA PALOMARI SPOLIDORIO

3. Profa. Dra. ISABEL YOKO ITO

4. Profa. Dra. MARCIA PINTO ALVES MAYER

5. Prof. Dr. REGINALDO BRUNO GONCALVES

002196 02

Dedico este trabalho ...

**... aos meus pais, Vicente e Glória, que me ensinaram
através da dedicação, compreensão, dignidade
e amor, a viver.**

À minha esposa,

Cláudia,

**por tudo que representa em minha vida, pelas
horas abnegadas de convívio para que mais esta
etapa se cumprisse, servindo de fonte de
esperança e inspiração.**

Agradeço ...

... a Deus

por estar sempre no meu caminho.

Aos meus irmãos,

Luciano, Martha e seu esposo Geraldo,

**por terem compartilhado comigo todas as
emoções, dúvidas, êxitos e tropeços durante
toda minha vida, estimulando-me sempre a
prosseguir.**

Ao meu orientador,

Prof. Dr. José Francisco Höfling,

a quem respeito e admiro como pessoa e pesquisador, por ter acreditado em meu potencial, pela orientação segura, pelo carinho e atenção sempre presentes durante a realização deste trabalho. E sobretudo, por todas as oportunidades que me foram dadas proporcionando meu crescimento profissional e pessoal.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum, pelo acolhimento e pela oportunidade de intensificar e aprimorar meus conhecimentos.

À Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury, Coordenadora Geral do Curso de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP.

À Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP.

À todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, pelos ensinamentos durante o curso de Mestrado e Doutorado.

Aos Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves e Prof. Dr. Celso Paulino da Costa (FOP-UNICAMP) pelo companheirismo e apoio sempre presentes na Disciplina de Microbiologia e Imunologia.

A Profa. Dra. Izabel Yoko Ito (USP- Ribeirão Preto), Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer (ICB- USP) e Profa. Dra. Denise M. P. Spolidorio (UNESP- Araraquã) por terem aceitado compor a banca examinadora e avaliar esta tese.

Ao Prof. Dr. Edvaldo A. R. Rosa e sua esposa Rosimeire T. Rosa, amigos inestimáveis que sempre estiveram presentes nos momentos difíceis, obrigado pelos ensinamentos, apoio e amizade sempre dispensados.

Aos funcionários da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP – UNICAMP), Anderson Laerte Teixeira e Wilma C. Ferraz pela amizade e respeito que sempre me distinguiram.

Aos amigos Prof. Marcelo F. Gomes Boriollo e Profa. Janaína A. Rodrigues solidários em todos os momentos deste trabalho.

Aos meus amigos Prof. Fábio de Abreu Alves, Prof. João E. Gomes Filho e Prof. Johnson Campideli Fonseca pelo incentivo, amizade e companheirismo demonstrados a todo instante.

Ao Sr. João Batista de Carvalho, D. Nailde de Lima Carvalho, Daniela de Lima Carvalho e Alex de Lima Carvalho pelo companheirismo e apoio sempre presentes.

Aos amigos Prof. Douglas C. Fonseca e Adriana, Prof. Heverson W. Pereira e Vanessa, Gustavo Pereira Silva e Renato Pereira Silva pelo incentivo e amizade sempre presentes em nossa convivência.

Aos amigos professores Marcone R. Luis, José Fernando Esteves, Luís Alberto Pereira e Marco Aurélio Fraga pelos ensinamentos e apoio à minha formação profissional.

Ao Centro Universitário de Lavras – UNILAVRAS, na pessoa de seu Magnífico Reitor Prof. Canísio Ignácio Lunkes pelo apoio concedido e acolhida.

À todos amigos do curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Bucodental e do Centro de Processamento de Dados da FOP – UNICAMP pelo companheirismo e solidariedade sempre recebidos.

À Fapesp pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstracts	4
Introdução	6
Revisão de Literatura	10
Material e Métodos	33
Resultados	41
Discussão	58
Conclusões	65
Referências Bibliográficas	67
Apêndice	86

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Tratamento da placa bacteriana “*in vitro*” para determinação da 36
concentração de carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali.
- Figura 2 -** Valores comparativos da produção de placa bacteriana “*in vitro*”, 42
por amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus*, cultivadas isoladamente
e em associação, em meio acrescido de diferentes carboidratos –
sacarose 10%, glicose, frutose e glicose (5%) + frutose (5%).
- Figura 3 -** Valores de pH em intervalos de tempo crescentes de amostras de 43
S. mutans cultivadas em meio acrescido de 10% de diferentes
carboidratos - sacarose, glicose, frutose e glicose (5%) + frutose
(5%).
- Figura 4 -** Valores de pH em intervalos de tempo crescentes de amostras de 45
S. sobrinus cultivadas em meio acrescido de 10% de diferentes
carboidratos - sacarose, glicose, frutose e glicose (5%) + frutose
(5%).
- Figura 5 -** Valores de pH em intervalos de tempo crescentes de amostras de 46
S. mutans / *S. sobrinus* cultivadas em meio acrescido de 10% de
diferentes carboidratos – sacarose, glicose, frutose e glicose (5%)
+ frutose (5%).
- Figura 6 -** Produção de carboidratos totais solúveis em ácido / mg placa “*in* 47
vitro” por amostra de *S. mutans* e *S. sobrinus* cultivadas
isoladamente e em associação.
- Figura 7 -** Produção de carboidratos totais solúveis em álcali / mg placa “*in* 49
vitro” por amostra de *S. mutans* e *S. sobrinus* cultivadas
isoladamente e em associação.
- Figura 8 -** UFC de *S. mutans* em meio BHI – ágar acrescido de rifampicina. 50
- Figura 9 -** UFC de *S. sobrinus* em meio BHI – ágar acrescido de 50
estreptomicina.
- Figura 10 -** Número de UFC/mL de *S. mutans* e *S. sobrinus* provenientes de 51
cultura mista em meio contendo 10% de sacarose em diferentes
períodos de incubação.

- Figura 11 -** Número de UFC/mL de *S. mutans* e *S. sobrinus* provenientes de 52
cultura mista em meio contendo 10% de sacarose em diferentes
períodos de incubação.
- Figura 12 -** Número de UFC/mL de *S. mutans* e *S. sobrinus* provenientes de 53
cultura mista em meio contendo 10% de sacarose em diferentes
períodos de incubação.
- Figura 13 -** Número de UFC/mL de *S. mutans* e *S. sobrinus* provenientes de 54
cultura mista em meio contendo glicose (5%) + frutose (5%) em
diferentes períodos de incubação.
- Figura 14 -** Número de UFC/mL X 10² provenientes da placa bacteriana “*in* 55
vitro” formada a partir do inóculo simultâneo de quantidades
iguais de *S. mutans* e *S. sobrinus* cultivadas em meios acrescidos
de diferentes substratos – sacarose (10%), glicose (10%), frutose
(10%) e glicose (5%) + frutose (5%).
- Figura 15 -** Número de UFC/mL X 10² provenientes da placa bacteriana “*in* 56
vitro” pre-formada por *S. sobrinus* e inoculada com amostras de
S. mutans cultivadas em meios acrescidos de diferentes substratos
– sacarose (10%), glicose (10%), frutose (10%) e glicose (5%) +
frutose (5%).
- Figura 16 -** Número de UFC/mL X 10² provenientes da placa bacteriana “*in* 57
vitro” pre-formada por *S. mutans* e inoculada com amostras de *S.*
sobrinus cultivadas em meios acrescidos de diferentes substratos
– sacarose (10%), glicose (10%), frutose (10%) e glicose (5%) +
frutose (5%).

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Valores médios da produção de placa bacteriana “*in vitro*”, por amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus* cultivadas, isoladamente e em associação, em meio acrescido de diferentes carboidratos - sacarose 10%, glicose 10%, frutose 10% e glicose (5%) + frutose (5%). 42
- Tabela 2 -** Valores médios de pH, em intervalos de tempo crescentes das amostras de *S. mutans* cultivadas em meio acrescido de diferentes carboidratos - sacarose 10%, glicose 10%, frutose 10% e glicose (5%) + frutose (5%). 43
- Tabela 3 -** Valores médios de pH, em intervalos de tempo crescentes das amostras de *S. sobrinus* cultivadas em meio acrescido de diferentes carboidratos - sacarose 10% , glicose 10%, frutose 10% e glicose (5%) + frutose (5%). 44
- Tabela 4 -** Valores médios de pH, em intervalos de tempo crescentes das amostras de *S. mutans* / *S. sobrinus* cultivadas em meio acrescido de diferentes carboidratos – sacarose 10%, glicose 10%, frutose 10% e glicose (5%) + frutose (5%). 46
- Tabela 5 -** Produção de carboidratos totais solúveis em ácido por *S. mutans* e *S. sobrinus* cultivadas, isoladamente e em associação, em meio acrescido de diferentes substratos –sacarose 10%, glicose 10%, frutose 10% e glicose (5%) + frutose (5%). 47
- Tabela 6 -** Produção de carboidratos totais solúveis em álcali por *S. mutans* e *S. sobrinus* cultivadas, isoladamente e em associação, em meio acrescido de diferentes substratos –sacarose 10%, glicose 10%, frutose 10% e glicose (5%) + frutose (5%). 49
- Tabela 7 -** Número de UFC/mL de *S. mutans* e *S. sobrinus* provenientes de cultura mista em meio contendo 10% de sacarose em diferentes períodos de incubação. 51
- Tabela 8 -** Número de UFC/mL de *S. mutans* e *S. sobrinus* provenientes de cultura mista em meio contendo 10% de glicose em diferentes períodos de incubação. 52

- Tabela 9 -** Número de UFC/mL de *S. mutans* e *S. sobrinus* provenientes de 53
cultura mista em meio contendo 10% de frutose em diferentes
períodos de incubação.
- Tabela 10 -** Número de UFC/mL de *S. mutans* e *S. sobrinus* provenientes de 53
cultura mista em meio contendo glicose (5%) + frutose (5%) em
diferentes períodos de incubação.
- Tabela 11 -** Número de UFC/mL provenientes da placa bacteriana “*in vitro*” 55
formada a partir do inóculo simultâneo de quantidades iguais de
S. mutans e *S. sobrinus* cultivadas em meios acrescidos de
diferentes substratos – sacarose (10%), glicose (10%), frutose
(10%) e glicose (5%) + frutose (5%).
- Tabela 12 -** Número de UFC/mL provenientes da placa bacteriana “*in vitro*” 56
pre-formada por *S. sobrinus* e inoculada com amostras de *S.*
mutans cultivadas em meios acrescidos de diferentes substratos
– sacarose (10%), glicose (10%), frutose (10%) e glicose (5%) +
frutose (5%).
- Tabela 13 -** Número de UFC/mL provenientes da placa bacteriana “*in vitro*” 57
pre-formada por *S. mutans* e inoculada com amostras de *S.*
sobrinus cultivadas em meios acrescidos de diferentes substratos
– sacarose (10%), glicose (10%), frutose (10%) e glicose (5%) +
frutose (5%).

RESUMO

O envolvimento de *S. mutans* e *S. sobrinus* nas relações de supressão e recolonização dentária, tem chamado a atenção dos pesquisadores no sentido de se entender melhor os mecanismos que determinam as interações entre esses microrganismos. A presente pesquisa teve como objetivo principal, contribuir para o entendimento do fenômeno *in vitro* entre esses microrganismos (amostras estreptomicina e rifampicina-resistentes), da quantificação de placa *in vitro* e a produção de ácidos e polissacarídeos extracelulares frente a diferentes carboidratos. Para a quantificação da placa bacteriana *in vitro*, amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus*, isoladas e em associação, foram inoculadas em tubos contendo meio BHI acrescido de diferentes carboidratos - sacarose, glicose, frutose, glicose + frutose adicionados de um bastão-capilar previamente pesado, possibilitando a quantificação de placa úmida formada. Para determinação da produção de ácidos, foram utilizadas medições contínuas, em intervalos de tempo regulares e crescentes, do pH dos meios de cultura acrescidos dos diferentes açúcares, onde as amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus* foram cultivadas. Os experimentos para determinação de carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali, foram realizados pelo método de dosagem destas substâncias, baseado na reação de um açúcar quando na presença de um ácido forte, formando compostos furfúricos. Para a determinação das relações de supressão bacteriana, amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus* foram inoculadas em meios de cultura acrescidos dos diferentes carboidratos – sacarose, glicose, frutose e glicose + frutose. A determinação da colonização e recolonização da placa bacteriana “*in vitro*” foi dividida em três

experimentos distintos: inoculação simultânea de *S. mutans* e *S. sobrinus*, inoculação de *S. mutans* sobre a placa pre-formada por *S. sobrinus* e inoculação de *S. sobrinus* sobre placa pre-formada por *S. mutans* em tubos contendo meios de cultura acrescidos dos diferentes carboidratos. Em adição aos experimentos de supressão, colonização e recolonização da placa *in vitro*, determinou-se o número de UFC/mL de cada espécie. De acordo com os resultados da quantificação da placa bacteriana *in vitro*, a espécie *S. mutans* e a associação *S. mutans* / *S. sobrinus* apresentaram a maior produção de placa (14,50 mg e 7,92 mg /placa, respectivamente) quando cultivadas em meios de culturas acrescidos de 10% de sacarose. Os valores médios encontrados nas medições de pH dos meios de cultura acrescidos dos diferentes substratos - onde foram cultivadas as amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus* - expressaram quedas significativas de pH nos intervalos de tempo estabelecidos. Os resultados obtidos na determinação de carboidratos totais solúveis em ácido, demonstraram que em meios de cultura acrescidos de sacarose e glicose + frutose, a espécie *S. mutans*, isoladamente, produziu concentrações mais elevadas destes carboidratos, com diferenças estatisticamente significantes em relação às espécies *S. sobrinus* e a associação *S. mutans* / *S. sobrinus*. As amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus*, isoladamente e em associação, produziram elevadas concentrações de carboidratos totais solúveis em álcali quando cultivadas em meios de cultura acrescidos de frutose e glicose + frutose. Nos experimentos de supressão e recolonização da placa bacteriana *in vitro*, os resultados demonstraram que, em todas as culturas mistas de *S. mutans* e *S. sobrinus* não houve detecção de células viáveis de *S. sobrinus* à partir do período de 12 horas de incubação e a espécie *S. mutans* inibiu o crescimento e recolonizou a placa pré - formada por *S. sobrinus*. Os resultados apresentados nesta pesquisa, sugerem que substâncias antibacterianas

produzidas pelo *S. mutans* podem inibir o crescimento de outras espécies, corroborando com outros dados da literatura - nesta linha de investigação – os quais apontam para um melhor entendimento dos mecanismos de interação bacteriana que envolvem estes microrganismos.

ABSTRACT

The involvement of the *S. mutans* and *S. sobrinus* in the dental colonization has directed the attention of the researchers in order to understand the mechanisms determining the interactions between these microorganisms. The present research aimed to evaluate the mechanisms of suppression and recolonization of the bacterial plaque “*in vitro*” between these microorganisms (streptomycin and rifampycin-resistant samples) and the plaque quantification “*in vitro*” beside acid and extracellular polysaccharide production by these species – isolated and in association – under different carbohydrates. For the quantification of the bacterial plaque “*in vitro*”, samples of *S. mutans* and *S. sobrinus*, isolated and in association, were inoculated in BHI media of different carbohydrates – sucrose, glucose, fructose, glucose + fructose added of a capillary stick previously weighted making possible the quantification of humid plaque “*in vitro*”. The determination of acids production, continuous measurements of the pH was made (in regular and growing time intervals) using culture media under different substrates where the *S. mutans* and *S. sobrinus* samples were cultivated. The experiments for the total soluble carbohydrates determination in acid and in alkali were accomplished by the method of total carbohydrates dosage in reaction of a sugar in presence of a strong acid, forming sulfuric compounds. Samples of *S. mutans* and *S. sobrinus* were inoculated in culture media added of different carbohydrates– sucrose, glucose, fructose and glucose + fructose for the determination of bacterial suppression. For the colonization and recolonization process of bacterial plaque “*in vitro*”, the tests was done as following: simultaneous inoculation of *S. mutans* and *S.*

sobrinus, inoculation of *S. mutans* on the pre-formed plaque by *S. sobrinus* and inoculation of *S. sobrinus* on the pre-formed plaque by *S. mutans* in culture media added of different carbohydrates. On the suppression, colonization and bacterial recolonization, BHI – agar media plus streptomycin or rifampycin was used to determine the CFU/mL for each specie. The quantification of the bacterial plaque “*in vitro*”, of the *S. mutans* specie and the association *S. mutans* / *S. sobrinus* showed the largest production of plaque (14,50 mg and 7,92 mg/plaque, respectively) when cultivated in culture media added of 10% of sucrose. Measurements of the culture media pH added of different substrates, of *S. mutans* and *S. sobrinus* species cultivation showed significant drops of the pH in all the time intervals. The total soluble acid carbohydrates determination using culture media added of sucrose and glucose + fructose, revealed that the *S. mutans* specie was responsible for the production of higher concentrations of these compounds in relation to *S. sobrinus* and the association of *S. mutans* / *S. sobrinus*. The *S. mutans* and *S. sobrinus* samples showed high concentration of total carbohydrates in alkali when cultivated in culture media added of fructose and glucose + fructose. The experiments involving suppression and recolonization of the bacterial plaque “*in vitro*” including *S. mutans* and *S. sobrinus* mixed cultures of 12 hours incubation period does not showed any viable cells left of *S. sobrinus* solely and the *S. mutans* specie was able to inhibit the growth and the recolonization of the bacterial plaque “*in vitro*” pre-formed by *S. sobrinus*. The results described in this research suggest that antibacteria substances produced by *S. mutans* may inhibit the growing of other species in accordance to the literature data available showing its significance in the bacterial plaque formation.

1. INTRODUÇÃO

A cavidade oral apresenta uma microbiota complexa e variada, compondo um elevado número de ecossistemas localizados (MENAHER, 1984). Esses habitats são susceptíveis às alterações ambientais, como por exemplo, a erupção dentária que promove mudanças na colonização, favorecendo de forma seletiva, as espécies que se aderem à essas novas superfícies. Os mecanismos que determinam essas relações com ênfase na cárie dentária e demais eventos biológicos que ocorrem na cavidade bucal, tem sido uma preocupação constante dos pesquisadores nessa área.

Muitos estudos tem sido realizados relacionando-se os microrganismos colonizadores dos dentes e o início das lesões cariosas (FITZGERALD et al. 1960; KRASSE, 1966; BOWENN, 1969; LOESCHE et al. 1973; BORDEN et al. 1980; AHMADY et al. 1993), demonstrando a interação entre a necessidade prévia de formação da placa bacteriana e o início dessa patologia, que ainda se apresenta como a mais freqüente da cavidade bucal (FITZGERALD et al. 1960; JORDAN & KEYES, 1966; IKEDA et al. 1990; OLSSON et al. 1992).

A cárie dentária é definida como uma doença infecciosa, localizada e crônica, cujas lesões iniciais se dão pela desmineralização do esmalte dental, decorrente da mudança ambiental provocada pela ação de ácidos produzidos pelos microrganismos formadores da placa bacteriana (CURY, 1992; LOESCHE, 1993).

As pesquisas realizadas nas décadas de 50 e 60, convergiram para o entendimento da etiologia e a identificação dos microrganismos causadores da cárie,

concluindo que os estreptococos, notavelmente o *Streptococcus mutans*, poderiam se apresentar como os microrganismos potencialmente mais cariogênicos. Estudos taxonômicos realizados com amostras dessa espécie, permitiram o conhecimento de variedades correspondentes ao *S. mutans*, através de testes bioquímicos, sorológicos e genéticos, classificando esses microrganismos dentro de um grupo denominado mutans, composto de oito espécies e seis sorotipos (CARLSSON, 1968; DRUCKER & MELVILLE, 1971; ZINNER & JABLON, 1968; BRATTHALL, 1970; COYKENDALL, 1970; DUNNY, et al. 1973; COYKENDALL, 1977; PERCH et al. 1974; WHILEY et al. 1991; ZHU et al. 2000).

Os estreptococos do grupo mutans, estão intimamente associados à cárie dentária, principalmente às de superfície lisa, devido a produção de ácidos e da capacidade desses microrganismos em produzir polissacarídeos extracelulares, decorrentes do aproveitamento de energia quando da hidrólise da sacarose presente na dieta, que facilitarão sua deposição sobre as estruturas dentárias (GIBBONS et al. 1966; JÜRGENSEN & ARAÚJO, 1967; MANDEL, 1974; TAKEHARA et al. 1985; ROLLA et al. 1985; DONOGHUE & PERRONS, 1991; WENNERHOLM et al. 1995).

A importância da dieta, particularmente da sacarose, como fator imprescindível para a instalação do processo carioso é demonstrada na literatura desde o século passado. Resultados de inúmeros experimentos em animais, desenvolvidos para avaliar a participação desse componente na cárie dentária, ressaltaram a importância da sacarose como o carboidrato mais cariogênico em relação aos outros açúcares (KRASSE, 1965; GUGGENHEIM et al. 1965; KEYES, 1968; FITZGERALD, 1968). A glicose também configura-se como um dos principais carboidratos da placa, entretanto, a maioria

dos carboidratos na matriz dessa estrutura, apresenta-se na forma de polímeros extracelulares, como glucanos (homopolímeros de glicose) ou frutanos (homopolímeros de frutose) sintetizados pelas bactérias (HOLTZ et al. 1972). Esses polímeros tem sido amplamente estudados e considerados como fatores determinantes para o desenvolvimento da cárie dentária.

Com relação à importância da microbiota presente na cavidade bucal como um componente imprescindível na deflagração e desenvolvimento desses mecanismos, os *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* são as espécies do grupo mutans mais freqüentemente isoladas de amostras salivares, e segundo alguns autores (BEIGHTON et al. 1987; KÖHLER & BJARNASSON, 1987; LINDQUIST & EMILSSON, 1991; AHMADY et al. 1993; HIROSE et al. 1993), podem apresentar um elevado potencial indutor de lesões cariosas quando isolados, no entanto, quando se apresentam associados ampliam o índice desse processo infeccioso em seus portadores.

O início e a evolução da cárie dentária são determinados por uma inter-relação parasita - hospedeiro, influenciada por diversos fatores ambientais cujas demonstrações “*in vitro*” (IKEDA et al. 1990; OLSSON et al. 1992) são provas da reprodutibilidade ou existência desse fenômeno *in vivo*. O estudo *in vitro* das inter-relações bacterianas entre *S. mutans* e *S. sobrinus* seria importante para se determinar o papel desses microrganismos no estabelecimento da placa bacteriana sobre as estruturas dentais e de seus potenciais indutores de lesões cariosas, corroborando assim, com os diversos trabalhos encontrados na literatura (IKEDA et al. 1988; IKEDA et al. 1990; LINDQUIST & EMILSSON, 1991; HIROSE et al. 1993; BABAAHMADY, 1998).

Com base nos pressupostos da literatura citada e dando continuidade à linha de investigação que se processa nos laboratórios de Microbiologia e Imunologia da FOP-UNICAMP, a presente pesquisa teve como objetivo o estudo da supressão e recolonização da placa bacteriana *in vitro*, entre *S. mutans* e *S. sobrinus*, a partir de amostras estreptomicina e rifampicina-resistentes, cultivadas isoladamente e em associação. Concomitantemente, foram avaliados a produção de ácidos e polissacarídeos extracelulares por essas espécies isoladas e em associação, frente a diferentes carboidratos com ênfase à cárie dentária.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Como muitos tecidos no corpo, a integridade dos tecidos orais depende da coexistência pacífica entre microrganismos e seu hospedeiro. A esterilidade dos tecidos não é um pré-requisito para a saúde, mas sim a existência de uma interação dinâmica entre processos aprimorados e compostos e enzimas prejudiciais, gerados pelo hospedeiro e por seus parasitas, na qual a integridade estrutural do tecido sofre alterações, mas mantém a função, composição e aparência características. A sucessão ecológica de uma microbiota saudável para uma microbiota patogênica envolve a organização temporal de vários eventos e a distribuição espacial de ecossistemas localizados que cooperam na criação de comunidades que atuam diretamente na etiologia das principais patologias que acometem a cavidade oral (BOWEN & TABAK, 1995).

Os principais nichos da microbiota bucal incluem os dentes, mucosas, saliva, língua e sulco gengival. As populações microbianas que compõem estes ecossistemas diferem tanto em aspectos qualitativos quanto quantitativos. Estudos quantitativos mostraram que os biofilmes de bactérias se formam nas superfícies dos dentes e no dorso da língua. Estudos nesta área levaram ao conceito de que as cáries dentárias eram resultantes da atividade localizada de bactérias que cobriam o dente, e o termo “placa microbiana gelatinosa” foi utilizado para descrever esta entidade (MENAKER, 1984). Entretanto, apenas em meados de 1950, é que foi demonstrado que estreptococos bucais poderiam produzir cárie dental em animais de experimentação.

A partir destes relatos, a correlação entre placa bacteriana e cárie dental, tem sido discutida por pesquisadores da área, considerando a existência prévia da placa bacteriana, de fundamental importância para o início e progressão de uma lesão cáriosa. As experimentações em animais, procurando demonstrar o agente etiológico desse evento biológico, tiveram sempre a preocupação em descrever a ocorrência de depósitos (placa dental) sobre e em volta das estruturas dentárias comprometidas pela lesão.

Os primeiros estudos (KRASSE, 1965; JORDAN & KEYES, 1966) relatavam que, amostras de estreptococos com potencial cariogênico eram diferenciadas das amostras não-cariogênicas, isoladas de animais livres de cárie, apenas pela capacidade dos primeiros fermentarem sorbitol. Entretanto, outra diferença entre as amostras poderia ser ressaltada, porque, embora apresentassem características bioquímicas e fisiológicas semelhantes, tinham comportamento adverso, quando inoculados na cavidade oral de “hamsters”, alimentados com uma dieta contendo açúcar formavam placa sobre as superfícies dentárias e, posteriormente apareciam as lesões cárias. Atualmente, vários estudos (SKORLAND et al. 1995; YAO et al. 1999), também tem ressaltado a importância de uma película de proteínas salivares adsorvidas à superfície do esmalte na colonização e desenvolvimento dos biofilmes dentários. Os resultados desses pesquisadores tem demonstrado, principalmente, a presença de proteínas como a estaterina, histatina e as PRPs (proteínas ricas em prolina) que podem evidenciar estágios diferentes de formação da película adquirida cuja composição química pode interferir diretamente na aproximação e adesão bacteriana à estrutura dentária.

A importância da dieta, e particularmente da sacarose, como fator imprescindível para instalação do processo cárioso é demonstrada na literatura desde o

século passado. Resultados de inúmeros experimentos em animais, desenvolvidos para avaliar a participação da dieta na cárie dentária, ressaltaram a importância da sacarose como carboidrato mais cariogênico em relação a outros substratos glicídios (KRASSE, 1965; GUGGENHEIM et al., 1965; EDWARDSSON & KRASSE, 1967; KEYES, 1968; KRASSE, 1968; FITZGERALD, 1968). Em complemento, GIBBONS et al. (1966) relatou a cariogenicidade em ratos, por amostras de estreptococos com habilidade de formar placa em presença de sacarose. Igualmente, GUGGENHEIM et al. (1966) descobriu que a indução de cárie dental em ratos - por estreptococos - foi maior naqueles alimentados com uma dieta a base de sacarose, quando comparada com outros açúcares ou com uma dieta ausente de açúcar.

Em meados de 1955, foi demonstrada a participação de estreptococos como agente etiológico da cárie, com a divulgação de trabalhos com ratos gnotobióticos (ORLAND et al., 1955; FITZGERALD et al., 1960); posteriormente reforçada com as experimentações empregando “hamsters” convencionais (FITZGERALD & KEYES, 1960), às quais seguiram o trinômio hospedeiro-sacarose-estreptococos, capaz de explicar a instalação e a progressão do processo cariioso (KEYES, 1960; KEYES & FITZGERALD, 1962; KEYES & FITZGERALD, 1963; FITZGERALD & KEYES, 1963).

Entretanto, ainda permanecia desconhecido o potencial de cariogenicidade de certas amostras de estreptococos e a razão pela qual a sacarose se constituía realmente como o carboidrato mais importante para a atividade cariiosa. O esclarecimento destes aspectos teve início com o trabalho de JORDAN & KEYES (1966), onde foi observado que amostras de estreptococos cariogênicas para animais, formavam abundante material mucilaginoso sobre a superfície de dentes extraídos, dentes artificiais, fio de aço inoxidável

e outros objetos, quando cultivados em meio básico, contendo 0,1% de sacarose. Amostras não-cariogênicas para animais não formavam placa “*in vitro*” nestas condições. A sacarose era imprescindível para a formação de placa, pois a adição de glicose, frutose, galactose, lactose, sorbitol ou a mistura de glicose-frutose, no sistema, não induzia a formação de placa mucilaginosa como acontecia com o emprego da sacarose. O trabalho demonstrou ainda, dois aspectos de importância máxima para relacionar o material mucilaginoso, sintetizado pelos estreptococos a partir da sacarose, com a lesão cariosa: a) material mucilaginoso foi acumulado sobre um eletrodo, que, quando mergulhado em solução de sacarose acusava abaixamento do pH em torno de 4.5 - 5.0, faixa suficiente e necessária para explicar a descalcificação do esmalte; o pH permanecia baixo por mais 3 horas com o eletrodo imerso em saliva sintética e sem substrato glicídico exógeno para metabolização; b) dente humano íntegro foi submetido ao esquema de formação de placa e, ao final de 3 semanas, havia abundante material mucilaginoso acumulado sobre sua coroa, observando-se por cortes histológicos, a ocorrência da cárie incipiente sob o depósito. Esses resultados, permitiram uma relação direta entre a presença de estreptococos e a capacidade de formar placa a partir da sacarose. Havia, portanto, indícios de que a sacarose era importante para a colonização de certos microrganismos sobre as estruturas dentárias, funcionando como precursora na síntese da placa mucilaginosa, que aderiu fortemente às superfícies, mesmo as mais lisas. Estes resultados (JORDAN & KEYES, 1966) davam mais consistência às diferenças estabelecidas entre os estreptococos cariogênicos e não-cariogênicos porque relacionavam os primeiros com capacidade de aderir particularmente às superfícies lisas.

As pesquisas realizadas nas décadas de 50 e 60, convergiram para o entendimento da etiologia da cárie dentária e para a identificação dos microrganismos causadores desta patologia, concluindo que os estreptococos, notavelmente o *Streptococcus mutans*, poderiam se apresentar como os microrganismos potencialmente mais cariogênicos. Estudos taxonômicos realizados com várias amostras dessas espécies, demonstraram variedades correspondentes a *S. mutans* (CARLSSON, 1968; DRUCKER & MELVILLE, 1971). Nesse sentido, a existência de diferenças sorológicas entre as cepas de *S. mutans* foi primeiramente observada por ZINNER & JABLON (1968), os quais demonstraram um certo grau de heterogeneidade entre as mesmas. Posteriormente, BRATTHALL (1970) estudando cepas de *S. mutans*, dividiu-as em cinco grupos baseados na presença de cinco diferentes antígenos específicos. Essa classificação foi baseada em reação de precipitação obtida pela difusão em gel que resultou na obtenção de cinco grupos sorológicos de a-e. Os relatos de taxonomia levados a efeito por CARLSSON (1968) e DRUCKER & MELVILLE (1971), demonstraram que cepas de *S. mutans* são fenotipicamente homogêneas. No entanto, COYKENDALL (1970) e DUNNY et al. (1973), obtiveram variações na constituição da base do DNA entre cepas de *S. mutans* e, posteriormente em experimentos de reassociação de DNA, demonstraram a existência de 4 grupos genéticos distintos (I a IV), levando COYKENDALL (1974) a propor subespécies ou “genoespécies” de *S. mutans*. Concomitantemente, COYKENDALL et al. (1974), descreveram um novo grupo (genótipo V), isolado da boca de ratos selvagens. Posteriormente, correlacionou esses genótipos com os sorotipos descritos por BRATTHALL (1970), afirmando que - dentre um genótipo - diferentes sorotipos e reações

bioquímicas poderiam ocorrer. Subsequentemente, PERCH et al. (1974), com base em estudos sorológicos, propuseram dois sorotipos adicionais (f e g).

Durante esse período, um novo esquema bioquímico foi proposto por SHKLAIR & KEENE (1974), para separação de *S. mutans*. A identificação foi baseada em provas de fermentação de manitol, sorbitol, rafinose, melibiose e na habilidade em produzir amônia de arginina. Assim, através de características bioquímicas, a existência de 5 grupos distintos (a-e) foram descritas, relacionando-as aos sorotipos de BRATTHALL (1970). Posteriormente, COYKENDALL (1977), propôs elevar as diversas subespécies de *S. mutans*, à categoria de espécie, tendo como base as suas composições moleculares. As cinco espécies descritas foram: *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. ferus*. Com base ainda, em estudos taxonomicos, BEIGHTON et al. (1984) propuseram mais uma espécie, *Streptococcus macacae*, pertencente ao grupo mutans apresentando o sorotipo c, assim como *S. mutans* e *S. ferus*; contudo, sua diferente composição genética a distingue das outras espécies que possuem o antígeno c e dos outros estreptococos do grupo mutans. BEIGHTON et al. (1991) propuseram um novo esquema bioquímico mais simplificado, baseado em testes enzimáticos e de fermentação de carboidratos para diferenciar cepas de *S. mutans* e *S. sobrinus*.

A comprovação de que variações em características bioquímicas, sorológicas e genéticas entre estreptococos do grupo mutans relacionam-se à espécie animal da qual foi isolado (BRATTHALL, 1970; COYKENDALL, 1974; PERCH et al., 1974), foi reconhecida pela última edição do manual de BERGEY (HARDIE, 1986), o qual descreve o grupo mutans de estreptococos, composto pelas espécies *S. cricetus*, *S. mutans*, *S. rattus*, *S. sobrinus*, *S. ferus* e *S. macacae*. WHILEY et al. (1988), propuseram mais uma espécie, *S.*

downei, sorotipo h, representando uma espécie distinta, pertencente ao grupo mutans. Recentemente, IGARASHI et al. (1996) utilizaram a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) para detecção de *S. mutans* diretamente da placa dental humana. A partir de primers específicos para a porção do gene dextranase (*dexA*) do *S. mutans* (sorotipo c) um fragmento de DNA – 172 bp – foi amplificado possibilitando a detecção específica dessa espécie. Os resultados indicaram que a técnica de PCR foi satisfatória para a detecção e identificação específica do *S. mutans* presente na placa bacteriana.

De acordo com os estudos de KOHLER et al. (1981), realizados através da técnica de imunofluorescência para identificação e classificação de sorotipos de estreptococos grupo mutans isolados de diferentes superfícies dentárias de crianças, o *S. mutans* apresentou-se em maior proporção em relação as demais espécies e a sua infecção prévia como determinante de cáries incipientes. A classificação das diferentes espécies de estreptococos grupo mutans levou a efeito diversos trabalhos como o de HUIS IN'T VELD et al. (1982) onde demonstraram que a presença da sacarose na dieta pode influenciar de forma qualitativa a colonização das superfícies dentárias. Os resultados dessa pesquisa determinaram que o *S. sobrinus* somente se estabeleceu sobre as superfícies dentárias, quando na presença do *S. mutans*, a partir de uma dieta enriquecida com sacarose. Os autores ainda ressaltam que o *S. sobrinus* pode ser sensível a uma determinada bacteriocina produzida pelo *S. mutans* sugerindo uma possível justificativa para a predominância dessa espécie no processo de colonização das superfícies dentárias.

Nesse sentido, DE SOET et al. (1990) pesquisaram a presença de *S. mutans* e *S. sobrinus* na saliva e placa bacteriana de escolares com idade de 5 anos na cidade de Reykjavik - Islândia (estudo 1) e 9 anos em Amsterdam – Holanda (estudo 2). Os

resultados demonstraram que 29% das crianças pertencentes ao estudo 1 e 35% do estudo 2, apresentavam as espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* colonizando juntas um mesmo microambiente, indicando uma associação positiva entre esses microrganismos.

Segundo LINDQUIST & EMILSON (1991), o *S. mutans* é a espécie mais freqüentemente encontrada na cavidade bucal, seguida pelo *S. sobrinus*. Neste estudo, os autores chamam a atenção para o grande número de sítios anatômicos da cavidade oral, onde ambas as espécies foram detectadas juntas, indicando, dessa forma, uma provável associação entre esses organismos. Nessa linha de investigação, HIROSE et al. (1993), SPOLIDORIO (1997) avaliaram a presença de *S. mutans* na saliva de 338 crianças entre 3 e 5 anos de idade e compararam aos índices de cárie dessas mesmas crianças. Os resultados mostraram que os escolares que possuíam as espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* apresentavam índices de cárie significativamente mais elevados que as crianças colonizadas por apenas uma das espécies, e que o *S. sobrinus* estava mais intimamente associados às lesões de superfície lisa, sugerindo uma maior capacidade de adesão desse microrganismo à estrutura dentária, quando comparada a espécie *S. mutans*. Recentemente, BABAAHMADY et al. (1998), realizaram um estudo correlacionando a presença de *S. mutans*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus* com o processo de iniciação de cáries, a partir de amostras de placa bacteriana de 64 crianças. Os autores concluíram que não houve relação entre *Lactobacillus* e as lesões iniciais de cárie, mas a presença de *S. mutans* e *S. sobrinus* juntos, estava fortemente correlacionada com este processo infeccioso.

A adesão dos estreptococos grupo mutans à superfícies duras, tem sido estudadas desde as primeiras publicações sobre o isolamento e identificação destes microrganismos. Os estreptococos grupo mutans, são aptos a produzir polissacarídeos

extracelulares a partir da sacarose (GUGGENHEIM & SCHROEDER, 1962; GIBBONS & BANGHART, 1971) e isto sugere que estes polímeros devem ser importantes na formação da placa dental. Posteriormente, GIBBONS et al. (1986) determinaram através da utilização laboratorial de cristais de hidroxiapatita e saliva acrescida da enzima glicosiltransferase, que as espécies de estreptococos grupo mutans possuem receptores específicos em sua superfície que podem interferir diretamente na sua adesão às superfícies dentárias recobertas pela película adquirida. Estudos recentes realizados por VENKITAMARAM et al. (1995) e KOPEC et al. (1997) à partir de enzimas glicosiltransferase B, C e D purificadas por cromatografia em coluna de hidroxiapatita seguida de ultrafiltração, tem demonstrado que estas enzimas encontram-se ativas tanto adsorvidas ao esmalte dental como em solução, podendo influenciar a aderência oral de estreptococos cariogênicos. Ainda segundo esses autores, as glicosiltransferases B (síntese de glucanos insolúveis em água), C (síntese de glucanos solúveis e insolúveis) e D (síntese de glucanos solúveis) produzidas por *Streptococcus mutans* e seus produtos formados à partir da sacarose podem apresentar um papel essencial na patogênese das cáries dentárias por produzirem glucanos estruturalmente distintos.

JÜRGENSEN & ARAÚJO (1967) descreveram a formação de placa *in vitro* por *Streptococcus mutans* em “hamsters” numa sequência experimental bastante simplificada, que empregava exclusivamente uma elevada concentração de sacarose, com a finalidade de oferecer condições mais favoráveis para a deposição do material mucilaginoso. Como superfície de depósito, foi utilizado um bastão de vidro ou uma secção de laminula fixados a um fio de aço inoxidável e esterilizados por autoclavação. Em tubos contendo caldo sacarosado à 5,0%, era inoculada uma cultura recente do microrganismo,

introduzindo-se, imediatamente, o bastão ou a lamínula na massa líquida e seguindo-se a incubação à 37° C, em microaerofilia. Com intervalos de 48 horas, e dentro de rigorosa cadeia asséptica, bastão e lamínula eram transferidos para outros meios com caldo sacarosado, repetindo-se sempre as mesmas condições de incubação. Com as sucessivas transferências, o depósito mucilaginoso avolumava-se gradativamente, com projeção de certas massas de material à semelhança de grandes colônias crescidas sobre as superfícies do bastão e da lamínula. Como controle da experiência, bastão e lamínula foram colocados - nas mesmas condições técnicas - em caldo glicosado à 5,0%, inoculados com a mesma amostra de estreptococos, não havendo formação de placa “*in vitro*”.

WENNERHOLM et al. (1995) demonstraram que a presença dos estreptococos grupo mutans, particularmente o *S. mutans* e o *S. sobrinus*, em números elevados na placa dental e na saliva é diretamente dependente do consumo freqüente de açúcares. O processo experimental consistia da avaliação periódica dos níveis orais de *S. mutans* e *S. sobrinus* em 20 pacientes seguindo-se os seguintes critérios para seleção dos participantes: possuir valores superiores a 300.000 UFC/mL de estreptococos na saliva, ser portador de *S. mutans* e *S. sobrinus* na saliva e ingerir açúcar freqüentemente. Esses indivíduos foram aleatoriamente divididos em um grupo teste (n=12) que foram aconselhados a restringir o consumo de açúcar por 6 semanas, e um grupo controle (n=8) que não recebeu nenhum aconselhamento dietético. Amostras de placa dental e saliva em períodos de 3, 6 e 12 semanas foram coletadas para análise. Os resultados mostraram que os níveis de *S. mutans* e *S. sobrinus* na saliva e na placa diminuíram durante as 6 semanas de restrição do açúcar. Ambas as espécies pareceram reagir de modo semelhante frente a restrição de açúcar tanto na saliva como na placa bacteriana. Após o exame de 12 semanas,

isto é, 6 semanas depois de restabelecida a dieta normal ao grupo teste, os valores das contagens de *S. mutans* e *S. sobrimus* haviam aumentado novamente, mas ainda permaneciam inferiores quando comparado aos valores do grupo controle.

GIBBONS et al. (1966) mostraram que, quando amostras de estreptococos cariogênicos eram cultivadas em caldo sacarosado, as células aderiam às paredes do frasco e se depositavam no fundo, embebidas em material gelatinoso, que foi considerado material capsular dos microrganismos. De certo modo, os autores estavam relatando a formação de placa “*in vitro*”, com recursos técnicos posteriormente ampliados no trabalho de GIBBONS & NYGAARD (1968) sobre a natureza do polissacarídeo sintetizado “*in vitro*” pelos estreptococos, especialmente o *S. mutans*, com finalidade de determinar o efeito dos vários dextranos sobre as características de aderência destes microrganismos.

O primeiro estudo que demonstrou diretamente a ocorrência de polissacarídeos na placa dental foi realizado por Mc DOUGALL (1964). Extratos de amostras de placa precipitados em etanol 70%, foram hidrolisados e análises revelaram que frutose era o único componente presente nessa estrutura. CRITCHLEY et al. (1967) extraíram amostras de placas com água fria e subsequentemente com hidróxido de sódio 0,5 N. A hidrólise ácida e cromatografia de papel do extrato dialisado com água fria, mostrou glucose e frutose como principais componentes, ao passo que glucose foi o principal constituinte no material hidrolisado extraído com álcali. O procedimento de extração foi repetido após uma incubação “*in vitro*” das amostras de placa em sacarose, o material solúvel em água foi uma mistura de frutano e glucano, enquanto que na fração solúvel em álcali encontrou-se um glucano que foi precipitado em etanol 45%. Assim, polissacarídeos extracelulares e glico-proteínas salivares nessas amostras, pareciam ser os principais

constituintes da matriz da placa e produzidos por determinadas bactérias orais a partir da sacarose. Os polissacarídeos isolados da placa dental tem sido demonstrado serem glucanos e frutanos. Entretanto, estes compostos não são homogêneos do ponto de vista químico apresentando diferenças na solubilidade. Devido a suas propriedades químicas e físicas os glucanos insolúveis tem sido considerados como a “peça de resistência” da matriz da placa dental.

GIBBONS & VAN HOUTE (1973), em seus relatos sobre formação de placa dental, citam que possivelmente o melhor exemplo de adesão interbacteriana mediada por polímeros bacterianos diz respeito aos *S. mutans*. Existem dados indicando que, o potencial indutor de lesões cariosas do *S. mutans* está associado com sua habilidade em formar placa dental, e que isto é dependente da síntese de polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose. O *S. mutans* forma depósitos microbianos aderentes na presença de sacarose, e isto origina uma extensa placa bacteriana em animais alimentados com uma dieta contendo esse substrato.

Estudando a relação da saliva e placa bacteriana com a cárie dental, MANDEL (1974) observou que a quantidade de matriz intercelular na placa é extremamente variável e amplamente dependente da dieta. A placa é formada mesmo em indivíduos alimentados por sonda, mas é fina e produz relativamente pouco ácido. Quando a ingestão de sacarose é alta, a placa cresce rapidamente, devido a formação de uma quantidade substancial de dextrano. Quando a ingestão é um pouco mais moderada (115g / dia), a quantidade de placa não é significativamente elevada, embora dextrano e levano estejam aumentados. Quando a glucose é o maior açúcar da dieta, a matriz intercelular

consiste de um hetero-polissacarídeo composto de glucose, galactose, hexosamina e pequenas quantidades de outros açúcares.

GAWRONSKI et al. (1975), realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito da sacarose sobre a concentração de polissacarídeos extracelulares. Assim, adultos jovens entre 21 e 24 anos de idade, foram examinados por acumulação de placa após 4 dias de ausência de higiene oral, sendo que a placa foi coletada da superfície lingual e vestibular de 28 dentes. Oito indivíduos que acumularam placa em excesso (obtendo por volta de 40 mg - peso úmido) enquanto ingeriam sua dieta normal, foram selecionados para o estudo. Esses indivíduos foram então submetidos a uma dieta rica e baixa em sacarose. Cada período da dieta de 12 dias era separado por uma dieta normal de 16 dias. Ao final de cada período de desenvolvimento, a placa foi removida e submetida a análise bioquímica. Os resultados mostraram uma correlação positiva entre dieta rica em sacarose e aumento na síntese de polissacarídeos extracelulares e intracelulares.

Em suas pesquisas ASHLEY & WILSON (1977), estudando a relação entre a experiência de açúcar da dieta, quantidade e composição bioquímica da placa dental em humanos, obtiveram os seguintes resultados: a) a dieta rica em açúcar foi associada com uma concentração significativamente menor de cálcio e fósforo e significativamente maior de carboidratos totais em relação às dietas livres de açúcar; b) há uma correlação positiva entre concentração de carboidratos da placa, com exceção dos carboidratos solúveis em álcali, e a quantidade de açúcar na dieta.

Estudos “*in vitro*” também mostraram que a sacarose pode não ser essencial para o ataque inicial de *S. mutans* às superfícies. CLARK et al. (1978) descobriram que células liofilizadas de *S. mutans* possuíam baixa atividade de glicosiltransferase (a enzima

envolvida na produção de polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose adsorvida da saliva). Evidências, entretanto, sugerem que a produção de glucanas a partir de sacarose podem ser importantes apenas no acúmulo subsequente de *S. mutans* e não na interação inicial entre *S. mutans* e superfícies duras. Estas evidências tem levado a sugestão (VAN HOUTE et al. 1977) que o ataque do *S. mutans* ao dente pode se dar em dois estágios, consistindo de uma fase inicial, reversível, dependente de parâmetros físico-químicos, seguida por uma fase irreversível envolvendo a produção de polímeros extracelulares.

Durante a década de 60, já haviam evidências de que estes polissacarídeos eram importantes constituintes da placa e que influenciavam o processo de cárie. De acordo com o trabalho de JENKINS (1978), existem três principais grupos de polissacarídeos que podem ser formados: a) polímeros da glicose (glucanos), formados como uma massa gelatinosa extracelular principalmente da sacarose, por uma enzima conhecida como glicosiltransferase; b) outra enzima (levanosucrase) converte sacarose em levanos (polímeros extracelulares da frutose); c) muitas bactérias orais estocam carboidratos como polissacarídeo intracelular tipo glicogênio. Ao contrário dos polissacarídeos extracelulares, que são formados essencialmente da sacarose, os polissacarídeos intracelulares podem ser formados a partir de uma variedade de açúcares (incluindo glucose, maltose e sacarose) e são metabolizados quando outras fontes de carboidratos estão ausentes, como entre as refeições.

GEDDES et al. (1978), observaram que mudanças visuais semelhantes à cáries iniciais ocorreram quando 10 voluntários não escovaram seus dentes por 14 dias e bochecharam uma solução de sacarose nove vezes ao dia - enquanto que o grupo controle que não bochechou com sacarose - revelou uma mudança no esmalte significativamente

menor. Entretanto, a concentração de fósforo e cálcio, e o peso úmido da placa acumulada durante o período sem higiene oral pelos dois grupos, não mostraram diferenças significantes, embora a concentração de carboidratos no grupo sacarose tenha sido significativamente maior. Ainda segundo a pesquisa de JENKINS (1978), descrevendo a síntese de polissacarídeos pela placa bacteriana, o autor cita que quando certas bactérias, incluindo várias espécies da placa, recebem sacarose, elas podem sintetizar vários tipos de polissacarídeos ou converte-la em ácido. Seguindo essa linha de pesquisa, DE SOET et al. (1991) compararam o potencial cariogênico das espécies do grupo mutans – *S. mutans* e *S. sobrinus* - mais freqüentemente isoladas da cavidade oral. Amostras dessas espécies foram inoculadas na cavidade oral de ratos que submeteram-se a dieta contendo 20% de sacarose e 5% de glicose pelo período experimental de 42 dias. Os resultados demonstraram que o número de lesões dentinárias avançadas em fissuras nos ratos colonizados por *S. mutans* foi significativamente menor que aqueles colonizados por *S. sobrinus*. Os autores ressaltam que o *S. sobrinus* produziu ácidos mais rapidamente quando comparado ao *S. mutans*, apresentando valores de pH entre 6,5 e 5,0, demonstrando um maior potencial cariogênico.

Posteriormente, estudos como de KIVELA et al. (1999), AOBA & MORENO (1991), ARENDS et al. (1992) e LOESCHE (1993), , utilizando-se de vários modelos experimentais, descreveram como ocorreria a dissolução do esmalte dental pelos ácidos produzidos pelas bactérias orais, especialmente os estreptococos grupo mutans, indicando que em um meio como a saliva, que está saturada com íons de cálcio e fosfato, o pH da placa teria que cair abaixo de 5,0 para ocorrer a desmineralização.

A partir de estudos como os de IMFELD et al. (1978), as pesquisas concentraram-se sobre a saliva como a variável mais provável capaz de influenciar o início

da cárie. Foi constatado que o pH da saliva, é notadamente constante, próximos da neutralidade, e não diferem entre indivíduos com atividade elevada de cárie e indivíduos livres de cárie. Demonstrou-se que o pH em uma lesão cariada se aproxima de 4,2, e a média do pH das superfícies cariadas era 0,7 unidades de pH menos do que a média das placas a superfície de dentes intactos. A rapidez e a magnitude desta produção de ácidos, sobrepujam a capacidade tampão disponível da saliva. O baixo pH, persistiu por mais de 60 minutos após a expectoração da glicose, demonstrando que os tampões salivares eram inadequados na neutralização dos ácidos na placa e / ou que o ácido estava sendo produzido continuamente na mesma. Esta última possibilidade foi sugerida pela queda continuada do pH nos indivíduos extremamente cárie-ativos. Posteriormente, VAN HOUTE et al. (1991) demonstraram em seus estudos laboratoriais que os estreptococos orais colonizadores das superfícies dentárias, principalmente os pertencentes ao grupo mutans, quando na presença de substratos glicídicos possuíam uma grande capacidade acidogênica acarretando, em períodos curtos de tempo, no abaixamento do pH salivar e da placa bacteriana a valores entre 4,6 e 5,0.

LOESCHE (1993), descreveu que uma placa em repouso produz basicamente ácidos acético e propiônico e uma placa exposta a sacarose produz grandes quantidades de ácido láctico. Os vários ácidos produzidos pela placa em repouso, além de estarem presentes em pequena quantidade não são capazes de formar complexos com o cálcio. Em outras palavras, eles não possuíam grande capacidade de desmineralização do esmalte. Quando a sacarose está presente, o perfil ácido da placa se altera significativamente, porque há um aumento de seis vezes na concentração de ácidos e estes incluem os ácidos succínico e láctico, os quais podem formar complexos com o cálcio.

Assim a sacarose é metabolizada em uma série de ácidos capazes de desmineralizar a superfície do esmalte dental. Qualquer queda no pH origina condições para o ácido produzido pela placa dental se difundir para dentro do esmalte onde solubiliza a hidroxiapatita, liberando íons cálcio e fosfato. O íon lactato forma complexos com o cálcio, nas camadas da superfície do esmalte, enquanto os íons menores de hidrogênio se difundem para as camadas mais profundas, causando a desmineralização característica da lesão incipiente. A quantidade de polissacarídeos de reserva, formados pela placa, mantem as condições ácidas na mesma, bem além do período em que a sacarose está na boca. Segundo a pesquisa de DIBDIN et al. (1995), onde avaliaram a variação do pH na placa dental de dois grupos de pacientes, sendo um com uso de sacarose na dieta, e outro com ausência de sacarose, concluíram que, em ambos os grupos ocorre queda do pH da placa, mas onde a sacarose estava presente, esta queda se manteve por um período mais longo.

BREX et al. (1981), descrevem que os polissacarídeos extracelulares sintetizados pelos microrganismos da placa a partir da sacarose podem ser importantes em dois aspectos, a saber, como reserva de energia e como constituintes da matriz da placa. Estes polissacarídeos extracelulares compreendem dextranos, mutanos e levanos, os quais são sintetizados pelas bactérias a partir da sacarose. Polissacarídeos intracelulares são produzidos como grânulos de reserva por muitas espécies bacterianas a partir de vários carboidratos tais como glucose, frutose e sacarose. Os resultados desta pesquisa indicam que frequentes bochechos com água, glucose ou sacarose não tem influência detectável sobre a morfologia ou quantidade de placa no estágio inicial da aderência bacteriana. Porém, demonstram que, uma relação dos possíveis efeitos dos carboidratos sobre os estágios avançados da formação da placa, parece estar fundamentada.

Um estudo envolvendo dietas ricas em sacarose e maltose, na qual amostras de dois dias de placa de 24 indivíduos, colhidas antes e durante 2 períodos de 25 dias, foi realizado por SKINNER et al. (1982). Os resultados mostraram que a concentração de polissacarídeos extracelulares na placa foi menor no grupo maltose em relação ao grupo sacarose. De acordo com RÖLLA et al. (1985), a sacarose é conhecida por possuir um maior potencial para induzir cáries do que a glicose e a frutose, apesar do fato dos monossacarídeos causarem uma alta ou mesmo maior produção de ácido “*in vitro*” pelos microrganismos da placa dental. É suposto que a cariogenicidade da sacarose é principalmente associada com a alta energia de sua hidrólise, a qual pode ser utilizada pela bactéria para síntese de glucanos insolúveis. Os polissacarídeos produzidos “*in vivo*” na presença de sacarose resultam em um grande acúmulo de placa, um fenômeno que por si só pode causar aumento da cariogenicidade. CARLSSON (1986), em seus estudos, chama atenção para um possível papel dos polissacarídeos intracelulares na patogenicidade dos microrganismos cariogênicos, pois durante os períodos do dia nos quais nenhum açúcar é suplementado pela dieta para a microbiota dos dentes, eles podem ser usados como fontes de energia e os ácidos são excretados. Durante um simpósio, MARGOLIS (1990), demonstrou que as mudanças químicas efetuadas pela fermentação dos carboidratos da dieta por microrganismos específicos na placa são refletidas em mudanças na composição do fluido da placa dental.

DE SOET et al. (1989) avaliaram “*in vitro*” a produção de ácidos por espécies de estreptococos colonizadores da cavidade oral. Os resultados mostraram que o *S. sobrinus* produziu significativamente mais ácidos quando comparado às demais espécies (*S. mutans*, *S. sanguis*) além de ser capaz de manter o pH do meio em níveis abaixo de 6,0 por

períodos mais longos de tempo, enquanto a produção das outras espécies cessou ou foi fortemente diminuída, sugerindo um maior potencial cariogênico do *S. sobrinus*.

Na tentativa de encontrar um açúcar que substituísse a sacarose, IKEDA et al. (1990) avaliaram a formação de placa e a produção de ácido láctico por amostras de *S. mutans* a partir de um meio de cultura contendo Nystose. Os resultados mostraram que o carboidrato utilizado (Nystose) não serviu como substrato para a produção de glucano através da enzima glicosiltransferase sintetizada pelo *S. mutans*; a aderência celular às superfícies de vidro foi quase nula; na presença de sacarose a Nystose inibiu a atividade da glicosiltransferase produzida pelo *S. mutans*; e o número de cáries em ratos alimentados com dieta contendo Nystose, e infectados com *S. sobrinus*, foi significativamente menor quando comparado com os ratos alimentados com sacarose.

A partir desses estudos, KOHLER et al. (1995) pesquisaram a relação entre a capacidade de produção de ácidos “*in vitro*” por amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus* isoladas de escolares e a experiência de cárie desses indivíduos. Os resultados desse estudo mostraram uma maior produção de ácidos “*in vitro*” pela espécie *S. sobrinus* em relação ao *S. mutans*, porém não revelou correlação entre a atividade glicolítica dessas espécies e a prevalência de cáries nas crianças das quais as amostras haviam sido isoladas. Os autores concluem que embora o *S. mutans* e *S. sobrinus* possuam acentuadas propriedades acidogênicas e acidúricas, é difícil correlacionar a atividade de produção de ácidos de culturas puras “*in vitro*” com o processo cariioso “*in vivo*”.

FU et al. (1991), compararam o efeito da espessura da placa sobre a retenção de glucose e ácidos orgânicos produzidos por placas contendo ou não glucanos, utilizando um modelo intra-oral de desmineralização do esmalte. Seus resultados mostraram que a

presença de glucano aumenta o índice de difusão e produção de ácido na camada mais profunda da placa adjacente à superfície dental. Estudando a velocidade de formação de placa bacteriana “*in vitro*”, MACPHERSON & DAWES (1991), concluíram que quanto mais rápido for a formação de placa, maior será a queda de pH do meio onde as bactérias foram cultivadas.

OLSSON et al. (1992), avaliaram “*in vitro*” a capacidade de adesão bacteriana a superfícies de vidro normais e superfícies de vidro tratados com óxido de polietileno, a fim de torná-las hidrofóbicas. Os resultados mostraram que as superfícies submetidas ao tratamento com óxido de polietileno sofreram uma menor adesão bacteriana em relação às superfícies de vidro normais. MARGOLIS et al. (1993), sugerem que o potencial cariogênico da placa “*in vivo*” pode também ser influenciado pelos polímeros que constituem parte da matriz da placa. Citam como exemplo, evidências que indicam que polímeros tais como glucano, produzido pelos estreptococos do grupo mutans a partir da sacarose, podem aumentar a porosidade da placa pelo aumento da distância interbacteriana e efetuar um aumento da difusão do substrato na placa. Um aumento na porosidade da placa pode, portanto, levar a um aumento da acidogênese bacteriana. Segundo DE SOET et al. (1991), analisando as diferenças no potencial cariogênico entre *S. mutans* e *S. sobrinus*, verificou que o número de lesões cáries em ratos colonizados por *S. mutans* foi significativamente menor que os colonizados por *S. sobrinus*, e o *S. sobrinus* também produziu ácidos mais rápido, ocasionando uma queda mais brusca do pH, quando comparado ao *S. mutans*. Os autores sugerem que estes resultados se devam a diferenças nas propriedades glicolíticas entre as duas espécies.

RUSSEL (1994), confirma a importância de bactérias específicas na etiologia das cáries dentais e doenças periodontais. Ainda neste trabalho, o autor defende o desenvolvimento de meios preventivos baseados no entendimento do metabolismo destas espécies bacterianas específicas, através de estudos moleculares que revelem os fatores de virulência a serem inibidos.

A sensibilidade de uma espécie para um determinado nicho pode, em parte, ser influenciada pela especificidade de aderência a determinados substratos, especialmente no caso dos colonizadores iniciais da cavidade bucal, e por inúmeras relações interespecíficas existentes entre os constituintes da microbiota oral. Esses mecanismos que regem a colonização das superfícies dentárias podem sofrer variações de acordo com fatores como a dieta e substâncias resultantes do próprio metabolismo bacteriano que podem modificar as características do meio ambiente e favorecer ou inibir o desenvolvimento de determinados microrganismos. DEYLOFF & SANDERS (1980) avaliaram “*in vitro*” a habilidade de bactérias orais humanas em inibir o *S. mutans*. Nesse estudo, os autores concluíram, de modo geral, a existência de uma extensa e inerente variabilidade de antagonismo microbiano por certas espécies influenciada diretamente pelas mudanças nas condições físico-químicas do meio. Em seguida, HILMAN et al. (1985) demonstraram em seu experimento a produção de bacteriocinas por uma amostra de *S. mutans* JH1001 que podem inibir o crescimento de outros microrganismos. Indivíduos colonizados pelo *S. mutans* JH1001 mostraram, após o período de dois anos e meio, uma microbiota persistente dessa espécie e um número significativamente reduzido de *S. mutans* indígena. Os autores indicam que esses resultados sugerem a eventual aplicação terapêutica do *S. mutans* JH1001 como forma de prevenção das cáries dentárias.

FABIO et al. (1987) examinaram amostras de estreptococos humanos (particularmente o *S. mutans*) originados da placa dental a fim de se determinar o espectro de atividade de bacteriocinas (mutacinas). De acordo com esse trabalho, 89% das amostras de *Streptococcus mutans* estudadas produziram substâncias com largo espectro de atividade anti-bacteriana. As bacteriocinas produzidas mostraram uma acentuada atividade inibitória contra bactérias gram-positivas. Em estudos dessa natureza, KITAMURA et al. (1989) pesquisaram o efeito das bacteriocinas produzidas pelo *Streptococcus sobrinus* na infecção e estabelecimento do *S. mutans* em ratos “pathogen-free”. Verificou-se que quando inoculadas as duas espécies juntas o *S. sobrinus* inibiu completamente a colonização do *S. mutans* nas superfícies dentárias dos ratos. O *S. sobrinus* também eliminou a placa bacteriana formada previamente pelo *S. mutans* quando inoculado após o período de 2 dias, entretanto, quando inoculado 2 semanas após a inoculação do *S. mutans* ambas espécies coexistiram na placa depositada sobre as estruturas dentárias. Em relação a colonização em cada superfície dentária, o *S. sobrinus* inibiu o estabelecimento de *S. mutans* em superfícies lisas mas não em fissuras.

A análise detalhada da literatura disponível, demonstra uma preocupação constante dos pesquisadores em ampliar os conhecimentos que envolvem o estudo da cárie dentária, que ainda hoje é a patologia de maior frequência nas populações, de modo geral. Nesse sentido, vários estudos tem contribuído para um maior entendimento da microbiota oral envolvida na iniciação e desenvolvimento das lesões de cárie e seus processos de supressão e recolonização da placa bacteriana. O fato dos estreptococos grupo mutans, permanecerem como os microrganismos mais íntimamente relacionados à cárie e a necessidade de se conhecer melhor os mecanismos que tornam esses microrganismos os

principais indutores da placa dental, produtores de polissacarídeos extracelulares e ácidos, com ênfase na correlação destes fatores de virulência com o potencial indutor de lesões cárias dessas espécies, tem levado os pesquisadores a ampliar os estudos nessa área de atuação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem das amostras

Para o presente estudo, foram utilizadas 15 amostras de *Streptococcus mutans* e 15 *Streptococcus sobrinus*, pertencentes ao acervo de microrganismos da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. As espécies foram mantidas sob congelamento (freezer -20° C), em alíquotas de 5,0 mL em meio B.H.I. (Brain Heart Infusion - Difco) adicionado de 10% de glicerol, segundo TENOVUO et al. (1992).

3.2 Quantificação da placa bacteriana *in vitro*

Para quantificação da formação de placa *in vitro*, foram utilizadas culturas recentes das amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus*, previamente padronizadas pela escala de Mc Farland (tubo nº 02) em meio B.H.I. Uma alíquota de 0,2 mL de cada uma dessas amostras foram inoculadas em tubos de tamanho padronizado contendo 5,0 mL de meio B.H.I. acrescido de 10% dos diferentes carboidratos fermentáveis (individualmente) - sacarose, glicose, frutose, glicose (5%) + frutose (5%). Para a obtenção da placa *in vitro* pela associação das duas espécies, foram inoculadas 0,1 mL de cada espécie a fim de que o número de células de cada espécie seja igual no mesmo inóculo, e o total de células se iguale ao das espécies isoladas. Os tubos inoculados com as amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus* isoladas e em associação, foram acompanhados de um bastão-capilar de 4 centímetros de comprimento com as extremidades fechadas e uma delas recurvada na forma

de bengala. Os tubos foram incubados à 37° C durante 48 horas em estufa sob a concentração gasosa de 10% de CO₂.

Para efeito de quantificação da produção de placa *in vitro*, o bastão-capilar foi pesado antes das amostras serem inoculadas no meio B.H.I. acrescido de 10% dos carboidratos fermentáveis - sacarose, glicose, frutose, glicose (5%) + frutose (5%) - e após o período de incubação. Com este procedimento, foi possível quantificar a produção de placa úmida *in vitro* formada por cada espécie em relação aos diferentes açúcares, isoladamente e em associação, possibilitando uma avaliação comparativa entre elas.

3.3 Determinação da produção de ácidos

Para a determinação da capacidade de produção de ácido pelas amostras de estreptococos *S. mutans* e *S. sobrinus* - isoladas e em associação – foram utilizadas medições contínuas, em intervalos de tempo regulares, do pH do meio de cultura onde estas espécies foram cultivadas. As amostras foram previamente inoculadas em meio B.H.I. e incubadas a 37° C por 24 horas, em estufa sob a concentração gasosa de 10% de CO₂, para obtenção de culturas recentes, antecipadamente padronizadas pela escala de Mc Farland (tubo nº 2). Após este período de incubação, alíquotas de 0,2 mL de cada espécie foram inoculadas em meio B.H.I. à 10% dos diferentes carboidratos fermentáveis (individualmente) - sacarose, glicose, frutose, glicose (5%) + frutose (5%). Para a associação das duas espécies, foram inoculadas alíquotas de 0,1 mL de cada espécie, para que o número de células de cada espécie seja o mesmo e o total de células inoculadas na associação igual ao das espécies isoladas. As medições foram realizadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, modificados a partir de alguns padrões encontrados na literatura

(STEPHAN, 1944; LOESCHE, 1993), sendo a primeira medição no momento da inoculação (zero hora) e as seguintes em 3, 6, 12, 24 e 48 horas após, de modo que o período total de incubação seja dividido em períodos regulares e crescentes, possibilitando uma avaliação das quedas de pH durante todo o período de crescimento das amostras.

3.4 Determinação da concentração de polissacarídeos extra-celulares presentes na placa *in vitro* submetida a diferentes carboidratos

3.4.1 Determinação de carboidrato total solúvel em ácido

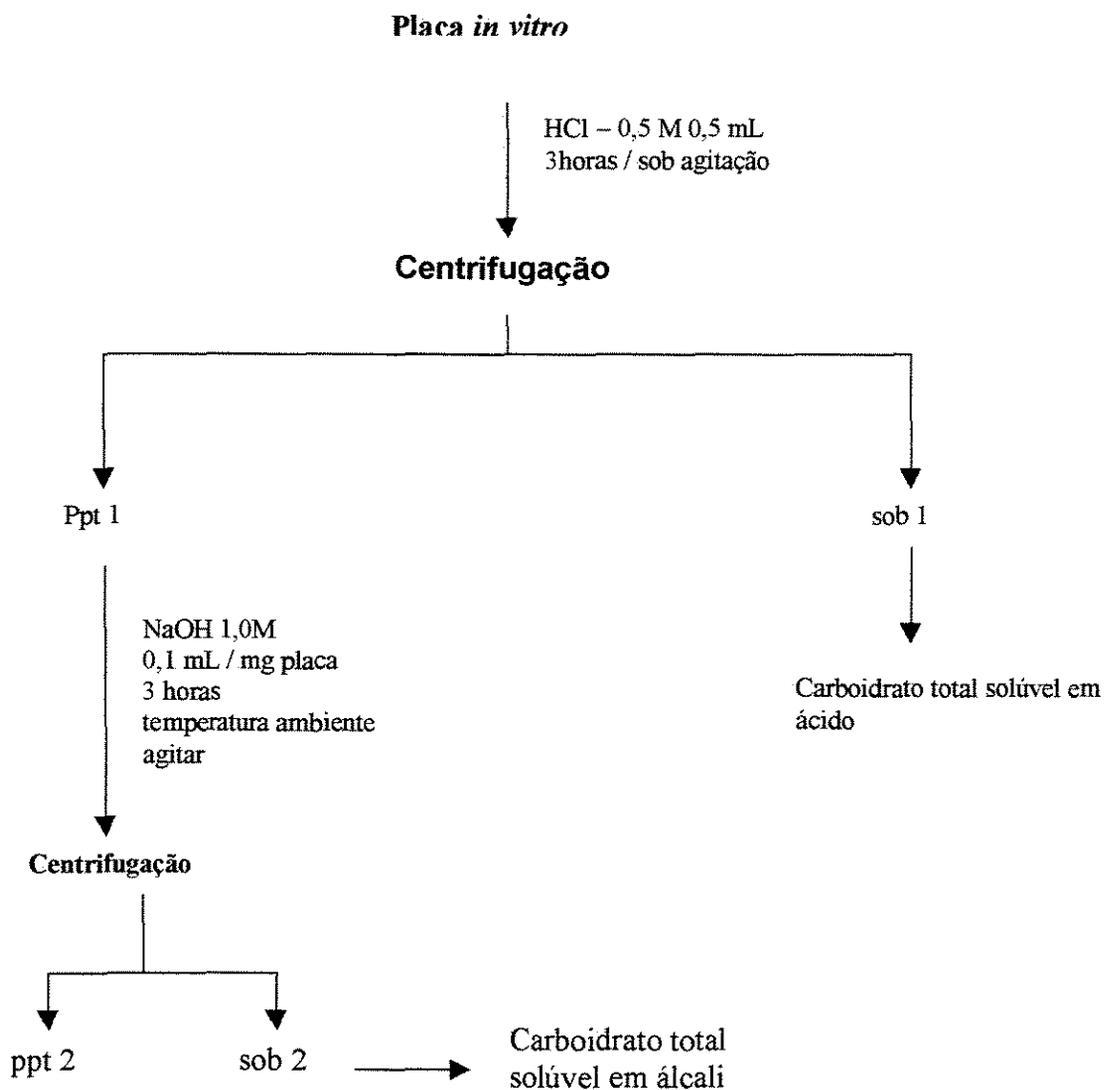
A determinação de carboidratos solúveis na amostra, foi realizada pelo método de dosagem de carboidratos totais (DUBOIS et al, 1956), o qual se baseia na reação de um açúcar quando na presença de um ácido forte (H_2SO_4), formando compostos furfúricos a partir de uma pentose ou hexose. Os compostos furfúricos na presença de fenol obtém uma coloração laranja, cuja intensidade é proporcional ao teor de açúcar presente na amostra. Decorridos 20 minutos, a intensidade de cor foi medida em espectrofotômetro digital (MICRONAL B342 II) a 490 nm. O resultado foi expresso em $\mu g / mg$ de placa *in vitro* (Figura 1).

3.4.2 Determinação de carboidrato total solúvel em álcali

A determinação de polissacarídeos solúveis em álcali foi feita pelo método de dosagem de açúcar total (DUBOIS et al, 1956) já descrito, e as dosagens foram

determinadas em espectrofotômetro digital (MICRONAL B 342 II). O resultado foi expresso em $\mu\text{g} / \text{mg}$ de placa *in vitro*.

Figura 1. Tratamento da placa *in vitro* para determinação da concentração de carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali.



3.5 Determinação diferencial das amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus*

As amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus* pertencentes ao acervo de microrganismos da disciplina de Microbiologia e Imunologia da FOP- UNICAMP foram submetidas a diferenciação através da inoculação em meio BHI acrescido de antibióticos, para determinação de cepas que fossem resistentes distintamente (*S. mutans* rifampicina-resistente e *S. sobrinus* estreptomicina-resistente) facilitando assim a separação, por meios seletivos, desses microrganismos quando cultivados em associação (IKEDA et al. 1988). Não foram obtidas cepas que apresentassem a possibilidade de isolamento das espécies de *S. mutans* e *S. sobrinus* após a realização de culturas mistas, portanto, para realização dos experimentos de supressão e recolonização *in vitro* foram utilizadas amostras de *S. mutans* 32K e *S. sobrinus* 6715 gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade de Chiba, Japão.

3.6 Supressão bacteriana

Foram utilizadas culturas recentes das amostras de *Streptococcus mutans* 32K rifampicina-resistente e *Streptococcus sobrinus* 6715 estreptomicina-resistente, previamente padronizadas pela escala de Mc Farland (tubo nº 02) em meio B.H.I. Uma alíquota de 0,2 mL de cada uma dessas amostras foram inoculadas em tubos contendo 5,0 mL de meio B.H.I. acrescidos de 10% de diferentes carboidratos fermentáveis (individualmente) – sacarose, glicose, frutose e glicose (5%) + frutose (5%) - e posteriormente incubados à 37°C durante 24 horas em estufa (Water-Jacked CO₂ Incubators / Cole Parmer Instruments – USA) sob a concentração gasosa de 10% de CO₂ (IKEDA et

al., 1988; REBELO, 1998). Em intervalos de tempo crescentes (3, 6, 12 e 24 horas) 0,1 mL das culturas mistas de *S. mutans* / *S. sobrinus* foram coletados, diluídos em séries decimais de 10^{-1} a 10^{-4} em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e plaqueadas em meio BHI-ágar contendo rifampicina (0,1 mg/mL) ou estreptomicina (1,0 mg/mL). Após a inoculação, as placas foram incubadas por 24 horas à 37° C em estufa sob a concentração gasosa de 10% de CO₂ e posteriormente submetidas a contagem do número total de células (Contador de Colônias Phoenix - UFC/mL) para cada espécie, permitindo a determinação da existência, ou não, de supressão entre esses microrganismos, durante o período de incubação, quando cultivados em associação.

3.7 Colonização e recolonização da placa bacteriana *in vitro*

Na avaliação dos processos de colonização e recolonização da placa bacteriana "*in vitro*", foram utilizadas culturas recentes de *S. mutans* 32K e *S. sobrinus* 6715 previamente padronizadas pela escala de Mc Farland (tubo nº 02) em meio B.H.I. Os tubos com esse meio, acrescidos com 10% de diferentes carboidratos fermentáveis, individualmente - sacarose, glicose (5%) + frutose (5%), glicose, frutose - foram inoculados com as amostras de *S. mutans* rifampicina-resistente e *S. sobrinus* estreptomicina-resistente, e adicionados de um bastão-capilar de aproximadamente 4,0 cm, com as extremidades fechadas na chama e uma delas dobrada na forma de uma bengala (OLIVEIRA, 1974), para o desenvolvimento da placa bacteriana "*in vitro*". Para melhor avaliação das interações bacterianas entre essas espécies, os procedimentos práticos foram divididos em três experimentos distintos, permitindo a determinação do potencial de colonização e recolonização da placa bacteriana *in vitro* (IKEDA et al. 1988).

3.7.1 Experimento I:

Foram inoculados simultaneamente, 0,2 mL de *S. mutans* e 0,2 mL *S. sobrinus* em tubos contendo 5,0 mL de meio B.H.I. contendo 10% dos diferentes carboidratos fermentáveis (individualmente) - sacarose, glicose, frutose, glicose (5%) + frutose (5%) - e o bastão-capilar. Os tubos foram incubados em estufa à 37° C sob tensão de 10% CO₂, por 48 horas.

3.7.2 Experimento II:

No segundo experimento, placa bacteriana *in vitro* pre-formada por *S. sobrinus* (48 horas), seguindo-se o padrão descrito anteriormente através da inoculação da amostra em meio B.H.I. contendo o bastão-capilar (OLIVEIRA, 1974), foi transferida para um novo tubo contendo meio de cultura recente acrescido de 10% dos diferentes carboidratos fermentáveis (individualmente) - sacarose, glicose, frutose, glicose (5%) + frutose (5%), e incubada com culturas de *S. mutans* por mais 48 horas em estufa à 37° C sob tensão de 10% CO₂.

3.7.3 Experimento III:

No terceiro experimento foi mantido o mesmo procedimento realizado anteriormente para o experimento II, porém iniciado a partir de placa bacteriana *in vitro* pre-formada por *S. mutans*, que foi transferida para um novo tubo contendo meio de cultura fresco acrescido de 10% dos diferentes carboidratos fermentáveis (individualmente) - sacarose, glicose, frutose, glicose (5%) + frutose (5%) - e incubada com culturas de *S.*

sobrinus, por 48 horas em estufa à 37° C sob tensão de 10% CO₂.

Ao final de cada experimento, a placa bacteriana *in vitro* foi dispersa sob vibração (ultra-som Thornton-Marconi) em solução salina estéril (NaCl 0,9%), e em seguida inoculadas em meio B.H.I.-ágar (Difco) contendo estreptomicina ou rifampicina. As placas inoculadas com as amostras (*S. mutans* / *S. sobrinus*) em B.H.I.-ágar foram incubadas por 24 horas em estufa à 37° C sob tensão de 10% de CO₂ e posteriormente submetidas à contagem do número de colônias (UFC/mL) para cada espécie, permitindo dessa forma, uma análise das relações entre *S. mutans* e *S. sobrinus* nos processos de formação da placa bacteriana *in vitro*, com ênfase nos mecanismos de supressão e recolonização dessas espécies.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos na quantificação da produção de placa bacteriana *in vitro*- por amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus* - cultivadas isoladamente e em associação, em meios acrescidos de 10% de diferentes substratos glicídicos - sacarose, glicose, frutose e glicose (5%) + frutose (5%) - encontram-se expressos na Tabela 1 e Figura 2.

A espécie *S. mutans* e a associação *S. mutans* / *S. sobrinus* apresentaram a maior produção de placa bacteriana (14,50 mg e 7,92 mg respectivamente) quando cultivadas em meio de cultura a 10% de sacarose, demonstrando uma diferença estatisticamente significativa em relação aos demais carboidratos, de acordo com o Teste de Tukey, considerando-se como nível mínimo de significância (n.m.s) 5%. Para a espécie de estreptococos do grupo mutans, *S. sobrinus*, cultivada isoladamente, os resultados encontrados demonstraram uma maior produção de placa bacteriana (7,20 mg) quando cultivada em meio acrescido de 10% de sacarose, não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a glicose (4,95 mg), mas sim, quando comparada a frutose (3,50 mg) e glicose + frutose (2,98 mg).

A Tabela 2 e Figura 3 descrevem os valores médios encontrados nas medições de pH do meio de cultura, onde foram cultivadas as amostras de *S. mutans*, em intervalos de tempo crescentes. As curvas demonstradas na Figura 3 expressam quedas significativas de pH em todos os meios de cultura acrescidos dos diferentes substratos glicídicos nos intervalos de tempo estabelecidos.

Tabela 1 – Valores médios da produção de placa bacteriana *in vitro*, por amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus* cultivadas, isoladamente e em associação, em meio acrescido de diferentes carboidratos -sacarose 10%, glicose 10%, frutose 10% e glicose (5%) + frutose (5%).

	<i>S. mutans</i>		<i>S. sobrinus</i>		<i>S. mutans / S. sobrinus</i>	
	mg-placa/48 hs*	SD**	mg-placa/ 48 hs	SD	mg-placa/ 48 hs	SD
Sacarose	14,50 ^A	15,18	7,20 ^A	5,09	7,92 ^A	3,42
Glicose	4,34 ^B	0,70	4,95 ^{AB}	0,71	4,15 ^B	0,88
Frutose	3,30 ^B	0,84	3,50 ^B	0,66	3,54 ^B	0,89
Glicose + Frutose	3,54 ^B	0,68	2,98 ^B	1,03	2,93 ^B	1,06

* médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

** desvio padrão

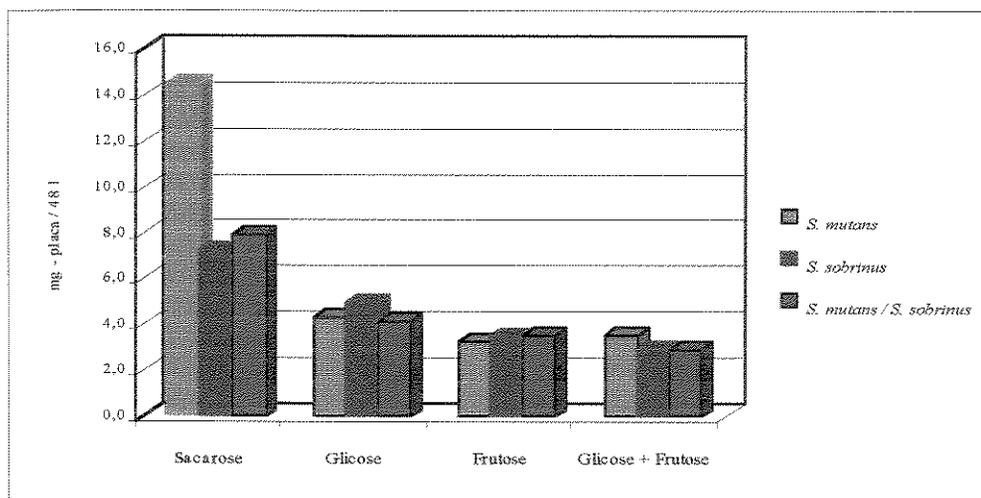


Figura 2 - Valores comparativos da produção de placa bacteriana *in vitro*, por amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus*, cultivadas isoladamente e em associação, em meio acrescido de diferentes carboidratos - sacarose 10%, glicose 10%, frutose 10% e glicose (5%) + frutose (5%).

A espécie *S. mutans* apresentou maiores quedas de pH quando cultivada em meio adicionado de 10% de sacarose nos períodos de 6 (5,16), 24 (3,98) e 48 (3,97) horas. No período inicial (3 horas) e de 12 horas, as maiores quedas de pH do meio de cultura

encontradas se devem aos meios enriquecidos com 10% de frutose (5,90) e glicose (4,27), respectivamente. O meio acrescido de glicose (5%) + frutose (5%) apresentou as menores quedas de pH quando inoculado com amostras de *S. mutans* em relação aos demais carboidratos.

Tabela 2 – Valores médios de pH, em intervalos de tempo crescentes das amostras de *S. mutans* cultivadas em meio acrescido de diferentes carboidratos - sacarose 10%, glicose 10%, frutose 10% e glicose (5%) + frutose (5%).

	3 hs	SD*	6 hs	SD	12 hs	SD	24 hs	SD	48 hs	SD
Sacarose	6,46	0,63	5,16	0,82	4,30	0,23	3,98	0,17	3,97	0,15
Glicose	5,98	0,45	5,72	0,63	4,27	0,21	4,01	0,21	4,10	0,21
Frutose	5,90	0,34	5,20	0,25	4,36	0,23	4,30	0,25	4,10	0,21
Glicose + Frutose	5,96	0,23	5,56	0,32	5,23	0,32	5,13	0,23	4,53	0,23

* desvio padrão

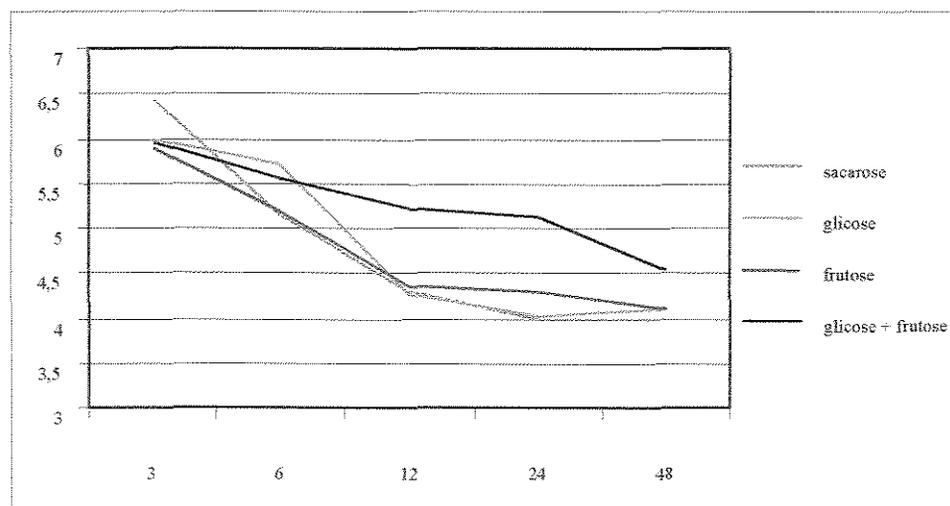


Figura 3 – Valores de pH em intervalos de tempo crescentes de amostras de *S. mutans* cultivadas em meio acrescido de 10% de diferentes carboidratos - sacarose, glicose, frutose e glicose (5%) + frutose (5%).

Os resultados da Tabela 3 e Figura 4, expressam os valores da produção de ácidos por amostras de *S. sobrinus* através de medições de pH do meio de cultura em intervalos de tempo crescentes. A espécie *S. sobrinus* apresentou maiores quedas de pH quando cultivada em meio a 10% de glicose, com valores de 5,63 (3 horas), 4,06 (24 horas) e 3,96 (48 horas). Nos períodos de 6 e 12 horas, as maiores quedas de pH se devem às amostras de *S. sobrinus* cultivadas em meio contendo 10% de sacarose (4,66) e frutose (4,26), respectivamente. A associação dos substratos: glicose (5%) + frutose (5%), mostrou as menores quedas de pH do meio em relação aos demais carboidratos utilizados para esse experimento.

Tabela 3 – Valores médios de pH, em intervalos de tempo crescentes das amostras de *S. sobrinus* cultivadas em meio acrescido de diferentes carboidratos - sacarose 10% , glicose 10%, frutose 10% e glicose (5%) + frutose (5%).

	3 hs	SD*	6 hs	SD	12 hs	SD	24 hs	SD	48 hs	SD
Sacarose	6,38	0,52	4,66	0,52	4,62	0,52	4,29	0,26	4,08	0,16
Glicose	5,63	0,57	5,30	0,46	4,44	0,54	4,06	0,32	3,96	0,40
Frutose	5,93	0,18	5,06	0,18	4,26	0,32	4,23	0,26	4,06	0,26
Glicose + Frutose	6,10	0,21	5,30	0,25	5,30	0,32	4,63	0,23	4,33	0,24

* desvio padrão

A Tabela 4 e Figura 5 expressam os valores encontrados nas medições de pH dos meios de cultura acrescidos de 10% dos diferentes carboidratos, em intervalos de tempo estabelecidos, quando inoculados com amostras da associação *S. mutans* / *S. sobrinus*.

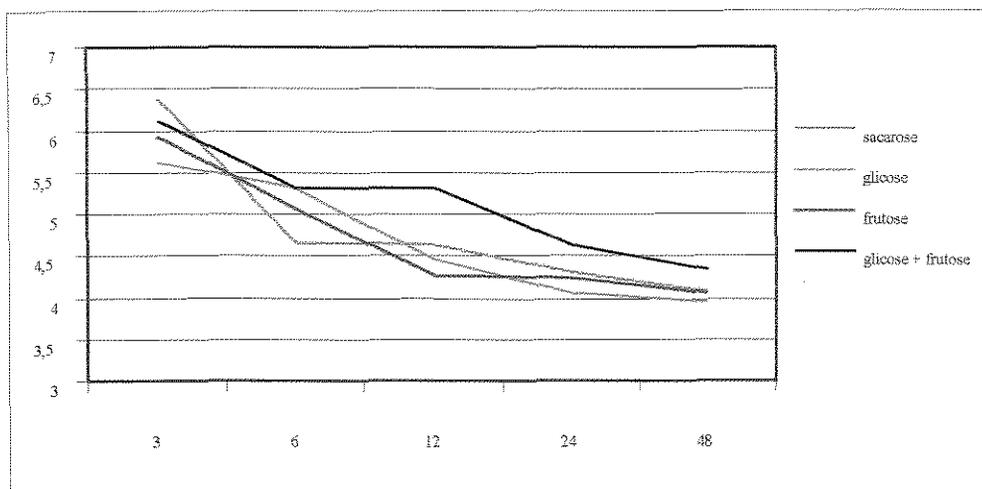


Figura 4 – Valores de pH em intervalos de tempo crescentes de amostras de *S. sobrinus* cultivadas em meio acrescido de 10% de diferentes carboidratos - sacarose, glicose, frutose e glicose (5%) + frutose (5%).

Entre os carboidratos analisados, a glicose com valores de 5,27 (3 horas), 5,10 (6 horas), 4,27 (12 horas) e 3,93 (24 horas) seguida pela sacarose – 5,13 (6 horas), 4,33 (12 horas) e 4,08 (48 horas) apresentaram as maiores quedas de pH do meio quando inoculados com a associação *S. mutans* / *S. sobrinus*. O meio de cultura acrescido de frutose obteve as maiores quedas de pH nos intervalos de tempo de 6 horas (5,10) e 48 horas (4,06). A associação de carboidratos glicose + frutose apresentou as menores quedas de pH em relação aos demais substratos.

Tabela 4 – Valores médios de pH, em intervalos de tempo crescentes das amostras de *S. mutans* / *S. sobrinus* cultivadas em meio acrescido de diferentes carboidratos - sacarose 10%, glicose 10%, frutose 10% e glicose (5%) + frutose (5%).

	3 hs	SD*	6 hs	SD	12 hs	SD	24 hs	SD	48 hs	SD
Sacarose	5,93	0,18	5,13	0,23	4,33	0,24	4,23	0,26	4,08	0,16
Glicose	5,27	0,61	5,10	0,39	4,27	0,08	3,93	0,26	4,16	0,24
Frutose	6,10	0,21	5,10	0,21	4,43	0,18	4,20	0,25	4,06	0,26
Glicose + Frutose	6,26	0,26	5,46	0,40	5,20	0,25	4,76	0,26	4,30	0,25

* desvio padrão

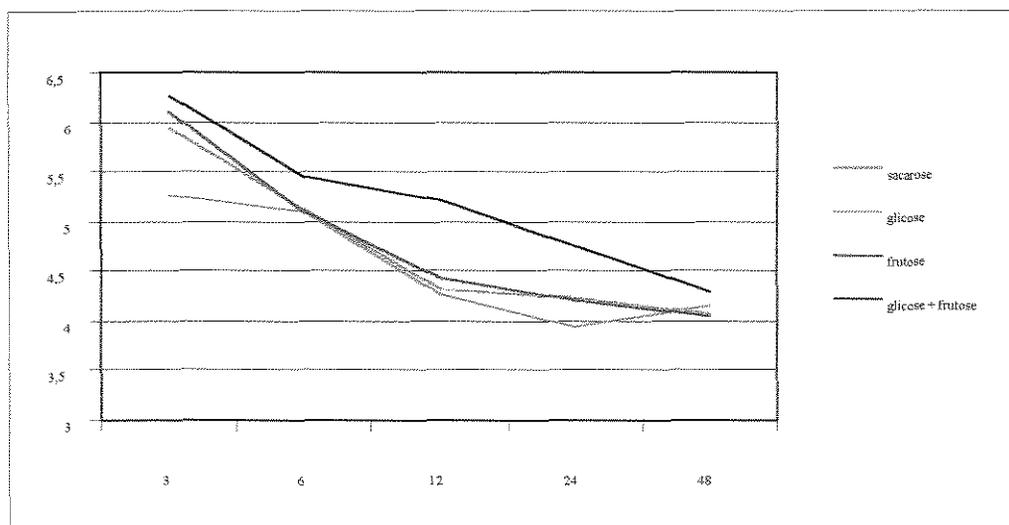


Figura 5 – Valores de pH em intervalos de tempo crescentes de amostras de *S. mutans* / *S. sobrinus* cultivadas em meio acrescido de 10% de diferentes carboidratos - sacarose, glicose, frutose e glicose (5%) + frutose (5%).

Os resultados obtidos na quantificação da produção de carboidratos totais solúveis em ácido por amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus*, cultivadas isoladamente e em associação, em meio de cultura acrescido de 10% de diferentes substratos – sacarose, glicose, frutose e glicose (5%) + frutose (5%) são demonstrados na Tabela 5 e Figura 6.

Tabela 5- Produção de carboidratos totais solúveis em ácido por *S. mutans* e *S. sobrinus* cultivadas, isoladamente e em associação, em meio acrescido de diferentes substratos -sacarose 10%, glicose 10%, frutose 10% e glicose (5%) + frutose (5%).

	Sacarose		Glicose		Frutose		Glicose + Frutose	
	µg carb./ mg placa ^a	DP	µg carb./ mg placa	DP	µg carb./ mg placa	DP	µg carb./ mg placa	DP
<i>S. mutans</i>	6,90 ^A	2,68	3,80 ^B	0,79	64,34 ^B	11,87	232,10 ^A	126,87
<i>S. sobrinus</i>	1,14 ^B	0,19	5,13 ^A	1,28	402,26 ^A	178,62	81,00 ^B	23,35
<i>S. mutans/S. sobrinus</i>	1,56 ^B	0,36	4,85 ^A	1,00	167,86 ^B	32,75	118,09 ^B	23,9

^a Valores médios (\bar{X}) e desvio-padrão (DP) - µg de carboidratos totais solúveis em ácido / mg de placa bacteriana *in vitro*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste Scott & Knott ($p < 0,05$).

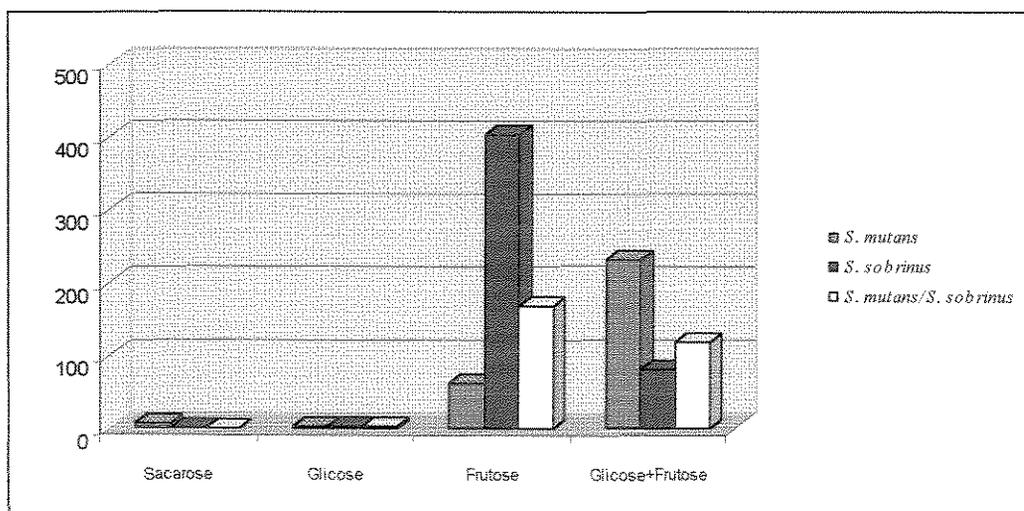


Figura 6 – Produção de carboidratos totais solúveis em ácido / mg placa *in vitro* por amostra de *S. mutans* e *S. sobrinus* cultivadas isoladamente e em associação.

A espécie *S. mutans* cultivada isoladamente em meio de cultura contendo sacarose ou glicose + frutose apresentou a maior produção de carboidratos totais solúveis em ácido com valores de 6,90 µg/mg placa e 232,10 µg/mg placa, respectivamente. Esses resultados diferiram estatisticamente ao nível de 5% pelo Teste Scott & Knott, quando

comparados à produção pela espécie *S. sobrinus* (1,14 µg/mg placa - sacarose; 81,00 µg/mg placa - glicose + frutose) e pela associação *S. mutans* / *S. sobrinus* (1,56 µg/mg placa - sacarose; 118,09 µg/mg placa – glicose + frutose).

Em meio de cultura acrescido de 10% de glicose as amostras de *S. sobrinus* (5,13µg/mg placa), cultivadas isoladamente, e a associação *S. mutans* / *S. sobrinus* (4,85 µg/mg placa) apresentaram maior produção de carboidratos totais solúveis em ácido com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao *S. mutans* (3,80µg/mg placa). Para o meio de cultura contendo 10% de frutose a espécie *S. sobrinus* produziu a maior quantidade de carboidratos totais solúveis em ácido por miligrama de placa bacteriana “*in vitro*” (402,26 µg/mg placa) quando comparada ao *S. mutans* e à associação *S. mutans* / *S. sobrinus* (167,86 µg/mg placa).

Com relação a produção de carboidratos totais solúveis em álcali, pelas amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus*, isoladamente e em associação, os resultados encontram-se expressos na Tabela 6 e Figura 7. Pode-se constatar que para o meio de cultura onde foram adicionados 10% de sacarose a espécie *S. mutans* (39,79 µg/mg placa) apresentou diferença estatisticamente significativa, comparando-se à produção da espécie *S. sobrinus* (4,60 µg/mg placa) e da associação *S. mutans* / *S. sobrinus* (3,96 µg/mg placa), considerando-se como nível mínimo de significância (n.m.s.) 5% pelo Teste Scott & Knott.

Para quantificação de carboidratos totais solúveis em álcali em meios de cultura acrescidos de glicose ou glicose + frutose, os resultados demonstraram uma maior produção pelas amostras de *S. sobrinus* (3,83 µg/mg placa) e pela associação *S. mutans*/ *S.*

sobrinus (46,43 µg/mg placa) respectivamente, porém esses valores não diferiram significativamente ($p < 0,05$) em relação aos demais microrganismos testados.

Tabela 6- Produção de carboidratos totais solúveis em álcali por *S. mutans* e *S. sobrinus* cultivadas, isoladamente e em associação, em meio acrescido de diferentes substratos -sacarose 10%, glicose 10%, frutose 10% e glicose (5%) + frutose (5%).

	Sacarose		Glicose		Frutose		Glicose + Frutose	
	µg carb./ mg placa ^a	DP	µg carb./ mg placa	DP	µg carb./ mg placa	DP	µg carb./ mg placa	DP
<i>S. mutans</i>	39,79 ^A	10,85	3,20 ^A	0,81	19,57 ^B	12,98	33,33 ^A	17,04
<i>S. sobrinus</i>	4,60 ^B	1,76	3,83 ^A	1,06	47,75 ^A	24,61	44,68 ^A	24,12
<i>S. mutans/S. sobrinus</i>	3,96 ^B	1,13	3,19 ^A	0,42	43,30 ^A	12,50	46,43 ^A	18,51

^a Valores médios (\bar{X}) e desvio-padrão (DP) - µg de carboidratos totais solúveis em álcali / mg de placa bacteriana *in vitro*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste Scott & Knott ($p < 0,05$).

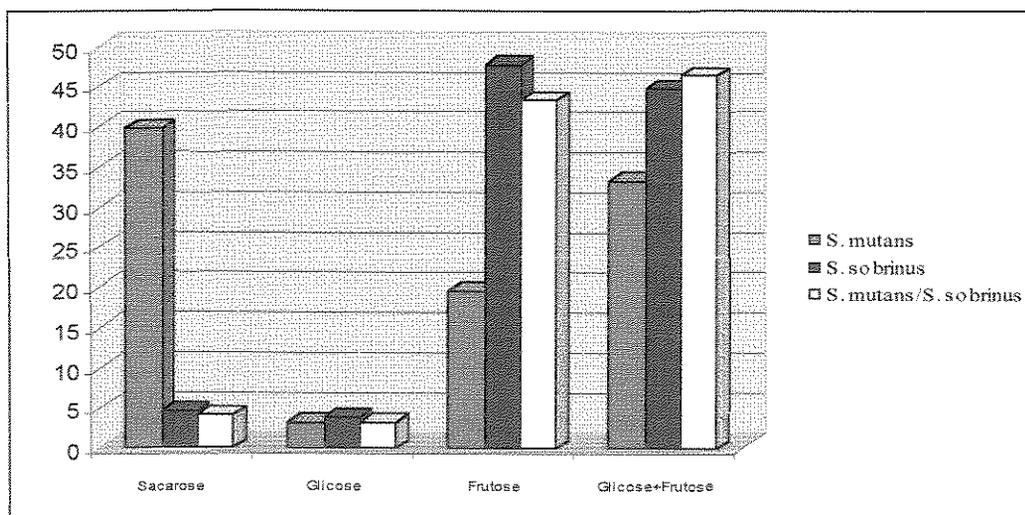


Figura 7 – Produção de carboidratos totais solúveis em álcali / mg placa “*in vitro*” por amostra de *S. mutans* e *S. sobrinus* cultivadas isoladamente e em associação.

Em relação ao teste com o meio de cultura contendo 10% de frutose, as maiores produções de carboidratos totais solúveis em álcali corresponderam as amostras *S. sobrinus* (47,75 µg/mg placa) e a associação *S. mutans* / *S. sobrinus* (43,50 µg/mg placa) com uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparada ao *S. mutans* cultivado isoladamente.

A determinação das relações de supressão bacteriana entre amostras de *S. mutans* 32 K rifampicina-resistente e *S. sobrinus* 6715 estreptomicina-resistente, cultivadas em associação, nos diferentes meios de cultura acrescidos de 10% de diferentes carboidratos (individualmente) – sacarose, glicose, frutose e glicose(5%) + frutose (5%) foi realizada através da contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) em meio BHI-ágar contendo rifampicina ou estreptomicina, como mostram as Figuras 8 e 9.

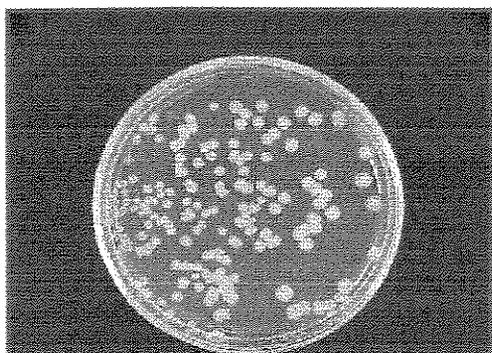


Figura 8 - UFC de *S. mutans* em meio BHI – ágar acrescido de rifampicina.

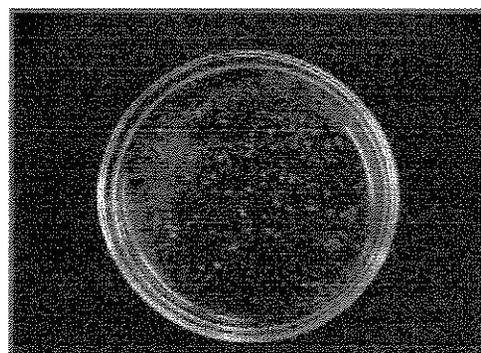


Figura 9 - UFC de *S. sobrinus* em meio BHI – ágar acrescido de estreptomicina.

A Tabela 7 e Figura 10 demonstram um predomínio do número de colônias (UFC/mL) de *S. sobrinus* em relação ao *S. mutans* nos períodos de incubação de 3 e 6 horas. Após este período, observa-se uma diminuição acentuada de células de *S. sobrinus*

comparando-se a contagem de UFC/mL da espécie *S. mutans*. À partir de 12 horas de incubação os inóculos, em meio contendo estreptomicina provenientes da cultura mista de *S. mutans* e *S. sobrinus*, não detectaram a presença de células viáveis de *S. sobrinus*.

Tabela 7 – Número de UFC/mL de *S. mutans* e *S. sobrinus* provenientes de cultura mista em meio contendo 10% de sacarose em diferentes períodos de incubação

	0 h- UFC/mL	3 h- UFC/mL	6 h- UFC/mL	12 h- UFC/mL	24 h- UFC/mL
<i>S. mutans</i>	$7,0 \times 10^5$	$4,06 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$	$1,62 \times 10^5$	$0,26 \times 10^5$
<i>S. sobrinus</i>	$7,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$	0,0	0,0

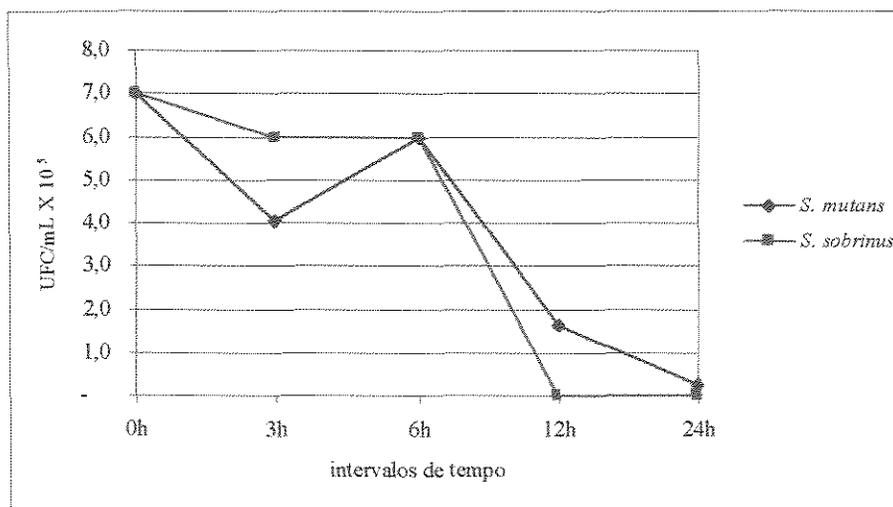


Figura 10 – Número de UFC/mL de *S. mutans* e *S. sobrinus* provenientes de cultura mista em meio contendo 10% de sacarose em diferentes períodos de incubação.

De acordo com as tabelas 8, 9 e 10 e Figuras 11, 12 e 13, as amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus* demonstraram um crescimento semelhante e independente do

substrato (glicose, frutose e glicose + frutose) adicionado ao meio de cultivo. Para todos os meios de cultura verifica-se um predomínio do número de UFC/mL da espécie *S. mutans* em relação ao *S. sobrinus* durante todo o período de incubação.

Tabela 8 – Número de UFC/mL de *S. mutans* e *S. sobrinus* provenientes de cultura mista em meio contendo 10% de glicose em diferentes períodos de incubação

	0 h- UFC/mL	3 h- UFC/mL	6 h- UFC/mL	12 h- UFC/mL	24 h- UFC/mL
<i>S. mutans</i>	7,0 X 10 ⁵	2,36 X 10 ⁵	2,30 X 10 ⁵	1,38 X 10 ⁵	3,72 X 10 ⁵
<i>S. sobrinus</i>	7,0 X 10 ⁵	0,30 X 10 ⁵	0,60 X 10 ⁵	0,0	0,0

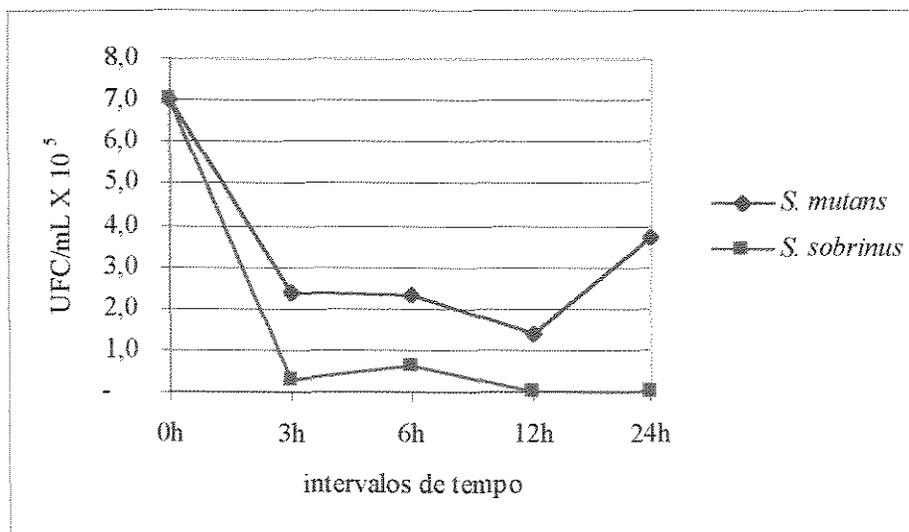


Figura 11 – Número de UFC/mL de *S. mutans* e *S. sobrinus* provenientes de cultura mista em meio contendo 10% de glicose em diferentes períodos de incubação

Tabela 9 – Número de UFC/mL de *S. mutans* e *S. sobrinus* provenientes de cultura mista em meio contendo 10% de frutose em diferentes períodos de incubação

	0 h- UFC/mL	3 h- UFC/mL	6 h- UFC/mL	12 h- UFC/mL	24 h- UFC/mL
<i>S. mutans</i>	$7,0 \times 10^5$	$2,46 \times 10^5$	$2,10 \times 10^5$	$1,26 \times 10^5$	$1,76 \times 10^5$
<i>S. sobrinus</i>	$7,0 \times 10^5$	$0,30 \times 10^5$	$0,82 \times 10^5$	0,0	0,0

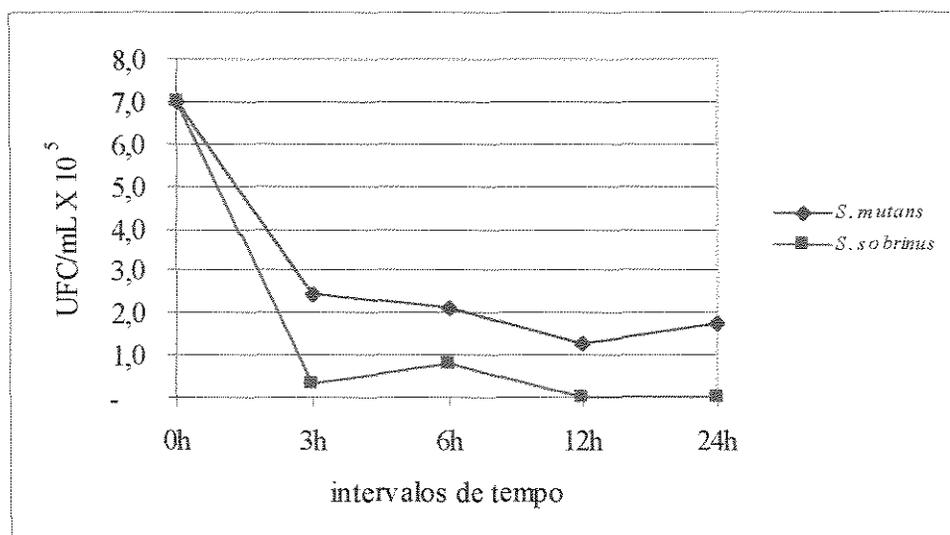


Figura 12 – Número de UFC/mL de *S. mutans* e *S. sobrinus* provenientes de cultura mista em meio contendo 10% de frutose em diferentes períodos de incubação

Tabela 10 – Número de UFC/mL de *S. mutans* e *S. sobrinus* provenientes de cultura mista em meio contendo glicose (5%) + frutose (5%) em diferentes períodos de incubação.

	0 h- UFC/mL	3 h- UFC/mL	6 h- UFC/mL	12 h- UFC/mL	24 h- UFC/mL
<i>S. mutans</i>	$7,0 \times 10^5$	$4,12 \times 10^5$	$2,96 \times 10^5$	$0,72 \times 10^5$	$2,46 \times 10^5$
<i>S. sobrinus</i>	$7,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$1,66 \times 10^5$	0,0	0,0

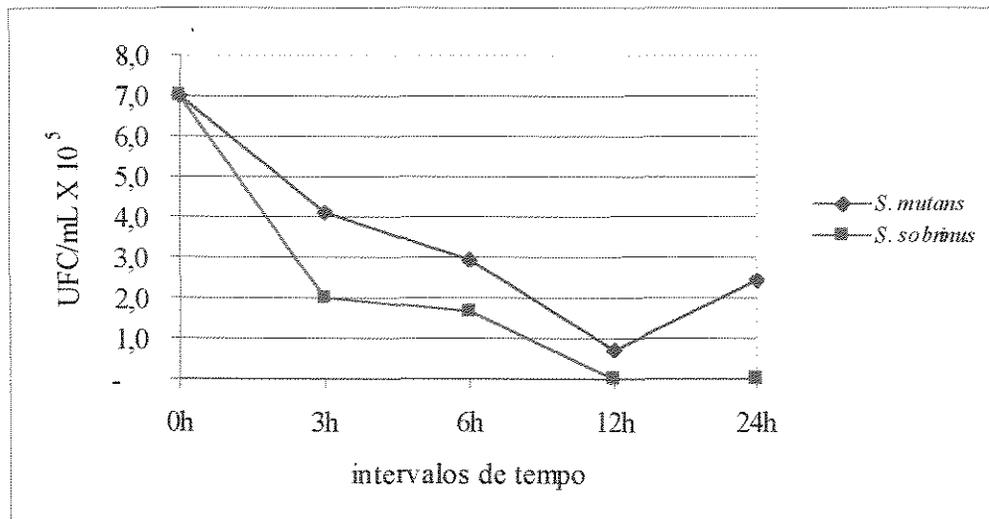


Figura 13 – Número de UFC/mL de *S. mutans* e *S. sobrinus* provenientes de cultura mista em meio contendo glicose (5%) + frutose (5%) em diferentes períodos de incubação

À partir de 12 horas de incubação, as amostras obtidas das culturas mistas de *S. mutans* e *S. sobrinus*, em meio acrescido de glicose, frutose e glicose + frutose, e inoculadas em meio BHI-ágar contendo estreptomicina não resultaram em unidades formadoras de colônia (UFC) como demonstrado nas Figuras 11, 12 e 13.

As interações bacterianas entre as espécies *S. mutans* 32K e *S. sobrinus* 6715 nos processos de colonização e recolonização da placa bacteriana *in vitro* em meios de cultura acrescidos de diferentes substratos – sacarose 10%, glicose 10%, frutose 10% e glicose (5%) + frutose (5%) – referentes aos experimento I, II e III são demonstrados nas Tabelas 11, 12 e 13 e Figuras 14, 15 e 16.

De acordo com esses resultados, verifica-se uma manutenção da presença de células viáveis de *S. mutans* ao final do período de incubação, enquanto ocorreu uma diminuição e eliminação da espécie de *S. sobrinus*.

Tabela 11 – Número de UFC/mL provenientes da placa bacteriana *in vitro* formada a partir do inóculo simultâneo de quantidades iguais de *S. mutans* e *S. sobrinus* cultivadas em meios acrescidos de diferentes substratos – sacarose (10%), glicose (10%), frutose (10%) e glicose (5%) + frutose (5%).

	sacarose	Glicose	Frutose	Glicose + frutose
<i>S. mutans</i> (UFC/mL)	0,08 X 10 ²	1,30 X 10 ²	1,36 X 10 ²	1,10 X 10 ²
<i>S. sobrinus</i> (UFC/mL)	0,06 X 10 ²	0,0	0,0	0,0

* Número de UFC/mL obtidos após o período de 48 horas de incubação a 37°C.

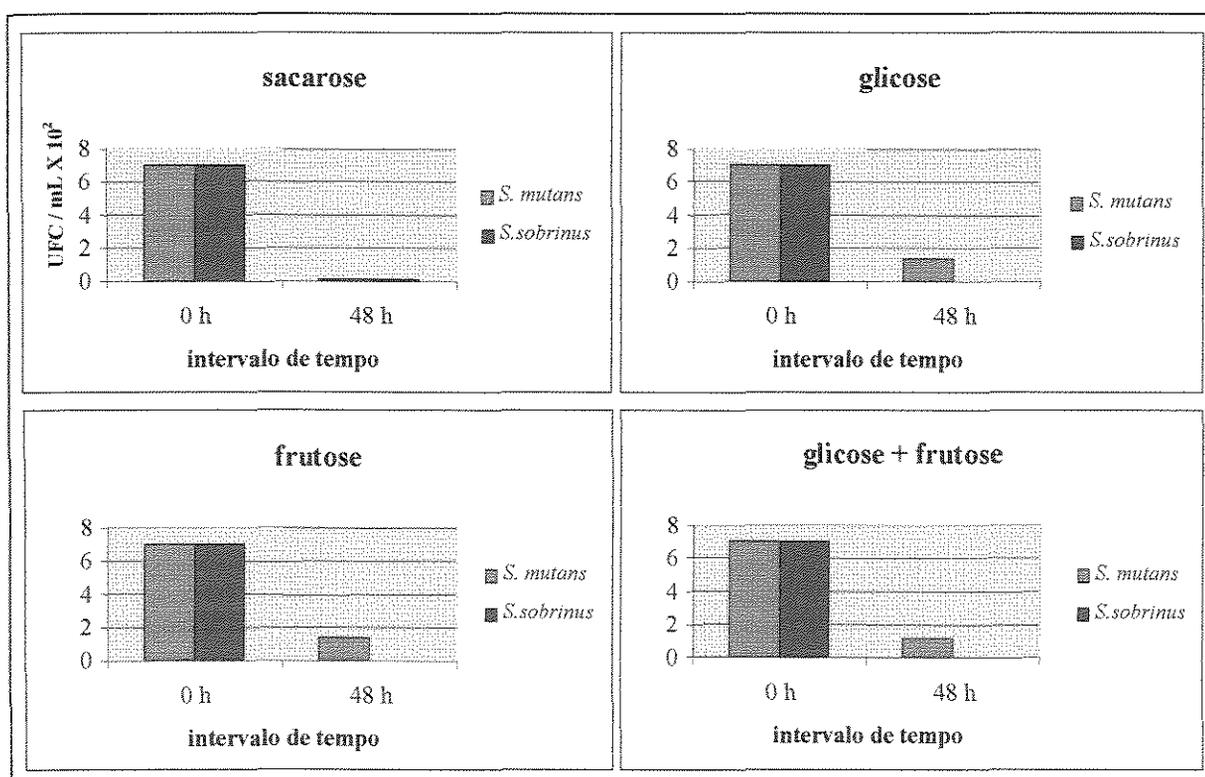


Figura 14 - Número de UFC/mL X 10² provenientes da placa bacteriana *in vitro* formada a partir do inóculo simultâneo de quantidades iguais de *S. mutans* e *S. sobrinus* cultivadas em meios acrescidos de diferentes substratos – sacarose (10%), glicose (10%), frutose (10%) e glicose (5%) + frutose (5%).

Tabela 12 – Número de UFC/mL provenientes da placa bacteriana *in vitro* pre-formada por *S. sobrinus* e inoculada com amostras de *S. mutans* cultivadas em meios acrescidos de diferentes substratos – sacarose (10%), glicose (10%), frutose (10%) e glicose (5%) + frutose (5%).

	sacarose	Glicose	Frutose	Glicose + frutose
<i>S. mutans</i> (UFC/mL)	$4,28 \times 10^2$	$4,25 \times 10^2$	$5,53 \times 10^2$	$6,25 \times 10^2$
<i>S. sobrinus</i> (UFC/mL)	$0,13 \times 10^2$	$0,21 \times 10^2$	$0,19 \times 10^2$	$0,22 \times 10^2$

* Número de UFC/mL obtidos após o período de 48 horas de incubação a 37°C.

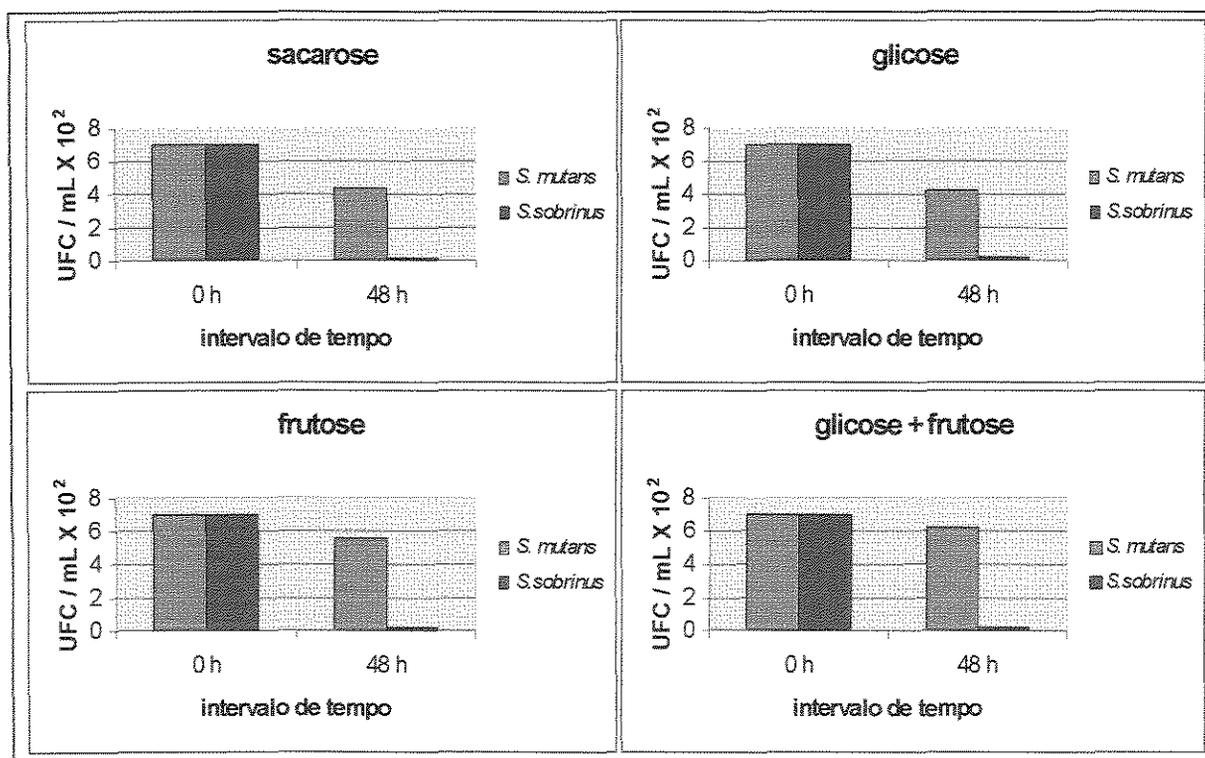


Figura 15 – Número de UFC/mL X 10² provenientes da placa bacteriana *in vitro* pre-formada por *S. sobrinus* e inoculada com amostras de *S. mutans* cultivadas em meios acrescidos de diferentes substratos – sacarose (10%), glicose (10%), frutose (10%) e glicose (5%) + frutose (5%).

Tabela 13 – Número de UFC/mL provenientes da placa bacteriana *in vitro* pre-formada por *S. mutans* e inoculada com amostras de *S. sobrinus* cultivadas em meios acrescidos de diferentes substratos – sacarose (10%), glicose (10%), frutose (10%) e glicose (5%) + frutose (5%).

	sacarose	Glicose	Frutose	Glicose + frutose
<i>S. mutans</i> (UFC/mL)	11,45 X 10 ²	38,23 X 10 ²	38,61 X 10 ²	9,0 X 10 ²
<i>S. sobrinus</i> (UFC/mL)	0,38 X 10 ²	0,0	0,0	0,31 X 10 ²

* Número de UFC/mL obtidos após o período de 48 horas de incubação.

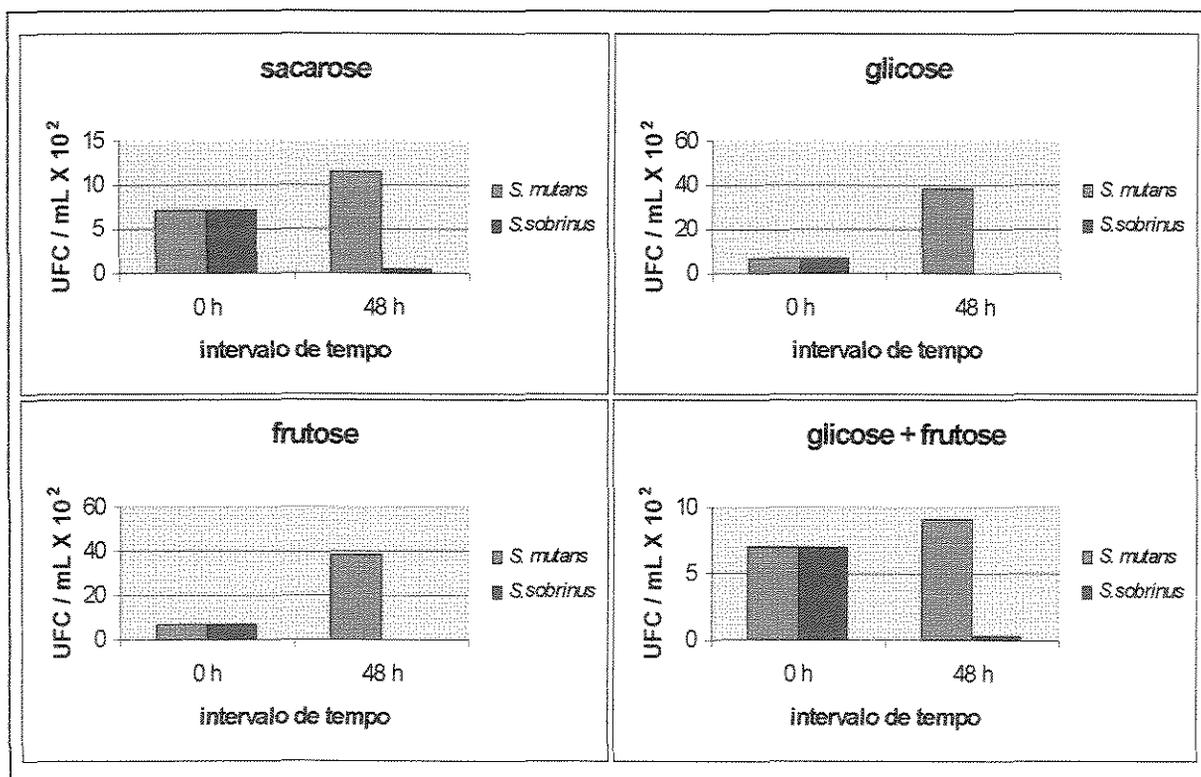


Figura 16 – Número de UFC/mL X 10² provenientes da placa bacteriana *in vitro* pre-formada por *S. mutans* e inoculada com amostras de *S. sobrinus* cultivadas em meios acrescidos de diferentes substratos – sacarose (10%), glicose (10%), frutose (10%) e glicose (5%) + frutose (5%).

5. DISCUSSÃO

A adesão dos estreptococos do grupo mutans às superfícies dentárias tem sido estudada desde que seu isolamento na cavidade bucal foi correlacionado com a cárie dentária (FITZGERALD et al. 1960; KRASSE, 1966; BOWEN, 1969; LOESCHE & SYED, 1973). A observação da formação da placa bacteriana *in vitro*, através da utilização de bastões - capilares ou lamínulas, mergulhados em meio de cultura acrescido de substratos glicídicos, se mostrou um recurso importante – como modelo experimental – no estudo da capacidade de adesão destes microrganismos à superfícies lisas, como fator de virulência levados a efeito nas últimas décadas (OLIVEIRA, 1974; IKEDA et al. 1988).

Os resultados obtidos na quantificação da placa bacteriana, por amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus* cultivadas, isoladas e em associação, em meio adicionado de 10 % de diferentes carboidratos fermentáveis - sacarose, glicose, frutose e glicose (5%) + frutose (5%) – demonstraram valores médios entre 2,93 mg para a associação *S. mutans* / *S. sobrinus* cultivada em meio contendo glicose + frutose e 14,50 mg para a espécie *S. mutans* em meio sacarosado, descritos na Tabela 1 e Figura 2. A espécie *S. mutans* (14,50 mg), isoladamente, e a associação *S. mutans* / *S. sobrinus* (7,92 mg) se mostraram estatisticamente superiores, quando cultivadas em meio acrescido de 10% de sacarose, demonstrando, através desse parâmetro de avaliação, uma maior capacidade de adesão e a importância desse substrato como sendo potencialmente mais cariogênico em relação aos demais carboidratos estudados. Tais resultados confirmam, parcialmente, os estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” levados a efeito por SCHEININ (1971), GAWRONSKI et al. (1975),

SKINER et al. (1982), IKEDA et al. (1990), LINDQUIST & EMILSON (1991), HIROSE et al. (1993) e LOESCHE (1993). A elevada produção de placa bacteriana *in vitro* pela associação *S. mutans* / *S. sobrinus*, confirmam também, os dados de EMILSON (1983), DAVEY & ROGERS (1984) e KÖHLER & BJARNASON (1987) os quais demonstraram uma associação positiva entre essas duas espécies. Em contraposição a essas afirmações, IKEDA et al. (1988) demonstraram, através de experimentos *in vitro*, que após 18 horas da inoculação de quantidades iguais de *S. mutans* e *S. sobrinus*, as células da espécie *S. sobrinus* estavam completamente mortas. Esses dados, no entanto, não invalidam a sugestão da existência de uma associação positiva entre as espécies *S. mutans* e *S. sobrinus*, mas com maior benefício favorecendo ao *S. mutans*, quando se analisa os vários experimentos *in vitro* e *in vivo* relatados pela literatura (LINDQUIST & EMILSON, 1991; HIROSE et al., 1993; BABAAHMADY et al., 1998).

Várias pesquisas tem sido realizadas visando um maior conhecimento do papel dos carboidratos presentes na dieta como fatores essencialmente predisponentes ao início e desenvolvimento de lesões cariosas (ASHLEY & WILSON, 1977; BRECX et al., 1981; MACPHERSON & DAWES, 1991). A sacarose apresentou-se como o substrato no qual as amostras bacterianas produziram maiores quantidades de placa "*in vitro*" em relação aos demais carboidratos analisados, com valores de 14,50 mg para a espécie *S. mutans*, 7,20 mg para o *S. sobrinus* e 7,92 mg para a associação *S. mutans* / *S. sobrinus*. Esses resultados confirmam, de modo geral, os estudos de autores como GIBBONS & VAN HOUTE (1973) e MARGOLIS (1993), os quais determinam a sacarose como principal substrato para a produção de polissacarídeos extracelulares e ácidos por estreptococos do grupo mutans. Os polissacarídeos extracelulares produzidos por esses

microrganismos – a partir da sacarose – podem aumentar a porosidade da placa dental e em consequência a distância interbacteriana, determinando a difusão do substrato e dos ácidos para a superfície dentária.

Os dados analisados referentes a capacidade “*in vitro*” das amostras de *S. mutans*, *S. sobrinus* e da associação *S. mutans* / *S. sobrinus*, em reduzir o pH do meio, acrescido de 10% de diferentes carboidratos, onde foram cultivadas, podem ser observados nas Figuras 3, 4 e 5. Os resultados demonstraram quedas significativas do pH do meio abaixo do nível crítico (5,5), principalmente aqueles enriquecidos com sacarose, glicose e frutose, nos três períodos iniciais (3, 6 e 12 horas) e uma tendência de manutenção ou elevação desses valores no período final (48 horas). Esses dados tem uma importância significativa em relação ao potencial cariogênico dessas espécies, isoladas e em associação, frente aos diferentes carboidratos, considerando-se as afirmações de CURY (1992) e LOESCHE (1993) os quais mostram que o pH de 5,5, na cavidade oral, é crítico para o esmalte dentário pois até este limite o produto iônico das concentrações de cálcio e fósforo na placa dental da maioria dos indivíduos é maior do que a dos íons em equilíbrio de uma suspensão de hidroxiapatita. Os autores ainda ressaltam, que a presença de microrganismos – como estreptococos – capazes de induzir a um pH menor que 5,5, faz com que a composição da placa dental em cálcio e fósforo torne-se inferior em relação ao produto de solubilidade da hidroxiapatita, e, deste modo, a tendência físico-química é o esmalte dental perder cálcio e fósforo para o meio bucal tentando atingir um novo estado de equilíbrio em função do pH alcançado, ocorrendo como consequência a dissolução do esmalte.

Os resultados obtidos da análise da produção de placa bacteriana *in vitro* e ácidos, mostram que esses determinantes são dependentes de diversos fatores que

interagem entre si e atuam diretamente no processo cariioso. Estudos comparativos *in vitro* e *in vivo* realizados concomitantemente devem ser levados a efeito no sentido de se entender, adequadamente, os mecanismos de colonização das superfícies dentárias e as interações entre as espécies de estreptococos do grupo mutans e os açúcares presentes na dieta, dando continuidade às pesquisas com ênfase no potencial cariogênico desses microrganismos.

Várias pesquisas tem sido realizadas, visando um maior conhecimento do papel dos polissacarídeos extracelulares, produzidos pelos estreptococos grupo mutans, como fator de virulência desses microrganismos (CRITCHLEY et al. 1967; GIBBONS & VAN HOUTE, 1973; BRECX, 1981; MARGOLIS et al. 1993). Os dados expressos na Tabela 5 e Figura 6, demonstram uma maior produção de carboidratos totais solúveis em ácido pelos estreptococos do grupo mutans quando cultivados isoladamente e em associação, em meios adicionados de frutose (10%) e glicose (5%) + frutose (5%). Do ponto de vista estrutural da placa e por conseguinte suas propriedades, os componentes mais importantes são os solúveis em álcali, que representam os polissacarídeos estruturais da placa dental. Os resultados encontrados na presente pesquisa, mostram na Tabela 6 e Figura 7 valores mais elevados na produção de carboidratos totais solúveis em álcali em meios acrescidos de sacarose (10%) para as amostras de *S. mutans* cultivadas isoladamente, e em meios adicionados de 10% de frutose e glicose (5%) + frutose (5%) para as amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus* cultivadas isoladamente e em associação. Esses dados sugerem um maior potencial cariogênico desses substratos glicídicos quando analisados em função do metabolismo de estreptococos do grupo mutans corroborando com os dados obtidos por FU et al. (1991), indicando que a maior concentração de polissacarídeos solúveis em álcali levaria como conseqüência à uma placa dental mais cariogênica, já que quedas mais

acentuadas de pH ocorreriam na interface dente-placa. Nessa linha de investigação, DIBDIN & SHELLIS (1988) e VAN HOUTE et al. (1989), citados por MARGOLIS et al. (1993), mostram que o potencial cariogênico da placa *in vivo* pode também ser influenciado pelos polímeros produzidos por estreptococos do grupo mutans, os quais constituem parte da matriz da placa aumentando a sua porosidade e em conseqüência a distância interbacteriana, determinando a difusão do substrato e dos ácidos produzidos por esses microrganismos.

Os resultados expressos, nas Figuras 2 e 7 não demonstram uma correlação positiva entre a produção de placa bacteriana “*in vitro*” e a produção de carboidratos totais solúveis em álcali pelas amostras de estreptococos do grupo mutans cultivadas em meios acrescidos de frutose (10%) e glicose (5%) + frutose (5%). A análise da dosagem desses carboidratos indicam uma concordância com os resultados apresentados por VENKITARAMAN et al. (1995) e KOPEC et al. (1997) onde esses autores afirmam, que a atividade enzimática (glicosiltransferases) sobre diferentes açúcares do substrato, podem levar a produção de diferentes polissacarídeos extracelulares, como resultado do metabolismo bacteriano com conformações moleculares variadas que os tornam insolúveis em ácidos. Esse fato, ainda segundo esses autores, sugere que parte desses homopolímeros detectados podem não participar do mecanismo de adesão microbiana às superfícies e conseqüentemente na formação da placa bacteriana.

A cárie dentária envolve mecanismos em um biofilme onde as interações microbianas com a superfície dental e entre si, as mudanças ecológicas provocadas pela dieta, os aspectos físico-químicos inerentes ao processo e a composição e propriedades da matriz da placa se interagem para a iniciação dessa patologia. Essas relações bacterianas

presentes no biofilme aderido ao esmalte dental são reguladas por vários fatores como a produção de bacteriocinas cuja definição proposta por GRÖNROOSS et al. (1998) evidencia essas substâncias como proteínas de ação antibacteriana que podem interferir no crescimento de outros microrganismos, geralmente bactérias intimamente relacionadas. As bacteriocinas produzidas pelos *S. mutans* são designadas mutacinas sendo essas proteínas importantes para o estabelecimento e equilíbrio dessa espécie na placa dental (GRÖNROOSS et al. 1998).

Os resultados obtidos à partir do experimento de supressão bacteriana evidenciado nas Figuras 10, 11, 12 e 13 demonstram comportamento semelhante das espécies de *S. mutans* e *S. sobrinus*, provenientes de culturas mistas, ao longo do período de incubação porém com maior número de UFC / mL em meios acrescidos de sacarose quando comparado aos demais carboidratos. Esses dados confirmam os estudos de ASHLEY & WILSON (1977), BRECX et al. (1981), MACPHERSON & DAWES (1991), GIBBONS & VAN HOUTE (1973) e MARGOLIS (1993) os quais determinam a sacarose como principal substrato para estreptococcus do grupo mutans sendo potencialmente mais cariogênico. Nos períodos iniciais de incubação (3 e 6 horas) a cultura mista em meio acrescido de sacarose apresentou um predomínio do número de UFC/mL da espécie *S. sobrinus* sobre a espécie *S. mutans*, enquanto nos meios adicionados com glicose 10%, frutose 10% e glicose 5% + frutose 5% encontrou-se um maior número de células viáveis de *S. mutans* em relação ao número de *S. sobrinus* durante o período de incubação. Em todos os meios de cultura testados à partir do período de 12 horas não houve detecção de células viáveis de *S. sobrinus*. Tais resultados estão de acordo com as pesquisas realizadas

por IKEDA et al. (1988), que através de experimentos *in vitro*, demonstraram a eliminação do *S. sobrinus* em culturas mistas pela produção de bacteriocinas por *S. mutans*.

Os dados analisados referentes a capacidade de colonização e recolonização da placa bacteriana por amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus* podem ser observados nas Tabelas 11, 12 e 13. Os valores apresentados indicam um maior número de células viáveis de *S. mutans*, confirmando também, os resultados obtidos por IKEDA et al. (1988) que demonstraram a habilidade dos *S. mutans* em produzir bacteriocinas que inibem o crescimento de outros estreptococos do grupo mutans invadindo e recolonizando a placa bacteriana *in vitro*. Esses dados sugerem que as bacteriocinas produzidas pelos *S. mutans* (mutalipocinas) podem eliminar bactérias sensíveis da placa resultando na sua maior colonização *in vivo*. Microrganismos pioneiros na colonização dos tecidos ganham posições ecológicas mais fortes e estas bactérias tornam-se mais difíceis de serem eliminadas pela infecção subsequente de outras espécies (IKEDA et al. 1988; MENAKER, 1984; BOWEN & TABAK, 1995).

A análise da produção de placa bacteriana *in vitro*, ácidos e carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali, mostram que esses determinantes são dependentes de diversos fatores que interagem entre si e atuam diretamente no processo cariioso. Estudos comparativos *in vitro* e *in vivo* devem ser levados a efeito, no sentido de se melhor entender os mecanismos de colonização das superfícies dentárias e as interações entre as espécies de estreptococos do grupo mutans e os açúcares presentes na dieta, com ênfase no potencial cariogênico desses microrganismos.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos nesta pesquisa permitiram concluir que:

1. A espécie *S. mutans*, isoladamente, e a associação *S. mutans* / *S. sobrinus* produzem quantidades superiores de placa bacteriana *in vitro* quando cultivadas em meio de cultura acrescidos de 10% de sacarose.
2. As amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus*, isoladas e em associação, comportam-se de modo diversificado ao longo do período de incubação, apresentando momentos distintos de maior abaixamento do pH do meio de cultura a valores inferiores ao considerado como crítico em relação ao produto de solubilidade do esmalte dentári.
3. Em meios de cultura acrescidos de sacarose e glicose + frutose a espécie *S. mutans*, isoladamente, produz concentrações mais elevadas de carboidratos totais solúveis em ácido.
4. As amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus*, isoladamente e em associação, produzem elevadas concentrações de carboidratos totais solúveis em álcali quando cultivadas em meios de cultura acrescidos de frutose e glicose + frutose.
5. A espécie *S. sobrinus*, em cultras mistas, apresentou maior número de UFC/mL, nos períodos iniciais de incubação (3 e 6 horas) em meio acrescido de sacarose, quando comparada ao *S. mutans*.

6. Em meios de cultura acrescidos de glicose, frutose e glicose + frutose a espécie *S. mutans* apresentou predomínio no número células durante todo o período de incubação quando cultivada em associação com *S. sobrinus*.
7. A espécie *S. mutans* inibiu o crescimento e recolonizou a placa bacteriana “*in vitro*” pré - formada por *S. sobrinus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHMADY, K.; MARSH, P.D.; NEWMAN, H.N.; BULMAN, J.S. Distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* at sub-sites in human approximal dental plaque. **Caries Res.**, Basel, v.27, p.135-9, 1993.
2. AOBA, T. & MORENO, E.C. Comparative solubility study of human dental enamel, dentin and hydroxiapatite. **Calcif. Tissue Int.**, New York, v.49, p.6-13, 1991.
3. ARENDS, J.; CHRISTOFFERSEN, J.; CHRISTOFFERSEN, M.R.; OGAARD, B.; DIJKMAN, A.G.; JONGEBLOED, W.L. Rate and mechanism of enamel desmineralization in situ. **Caries Res.**, Basel, p.18-21, 1992.
4. ASHLEY, F.P. & WILSON, R.F. The relationship between dietary sugar experience and the quantity and biochemical composition of plaque in man. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.22, p.409-14, 1977.
5. BABAAHMADY, K.G.; CHALLACOMBE, S.J.; MARSH, P.D.; NEWMAN, H.N. Ecological study of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus* spp. At sub-sites from approximal dental plaque. **Caries Res.**, Basel, v.32, p.51-8, 1998.

6. BEIGHTON, D.; MAYDAY, H.; RUSSEL, R.R.B.; WHILEY, R.A. *S. macacae* sp from dental plaque of monkeys. **Int. J. syst. Bact.**, Washington, v.34, p.332-5,1984.
7. BEIGHTON, D.; RIPPON, H.R.; THOMAS, H.E.C. The distribution of *S. mutans* serotypes and dental caries in a group of 5 to 8 year old Hampshire schoolchildren. **Br. Dent. J.**, London, v.162:, p.103-6,1987.
8. BEIGHTON, D. ; RUSSEL, R. R. B.; WHILEY, R.A. A sample biochemical scheme for the differentiation of *S. mutans* and *S. sobrinus*. **Caries Res.**, Basel, v.25, p.174-8, 1991.
9. BOWEN, W.H. The induction of rampant dental caries in monkeys (*Macaca irus*). **Caries Res.**, Basel, v.3, p.227-37,1969.
10. BOWEN, W.H.; TABAK, L.A **Cariologia para a década de 90**. São Paulo, Santos, 1995.
11. BORDEN, L.W.; OSTROM, C.A.; KONLONRIDES, T. Establishment of potentially cariogenic in an experimental human plaque: *Streptococcus mutans*. **J. dent. Res**, Washington, v.59, p.588-93, 1980.
12. BRATTHALL, D. Demonstration of five serological groups of streptococcal strain resembling *S. mutans*. **Odont. Revy.**, Malmo, v.21, p.143-52,1970.

13. BRECX, M.; THEILADE, J.; ATTSTROM, R. Ultrastructural estimation of the effect of sucrose and glucose rinses on early dental plaque formed on plastic films. **Scand. J. dent. Res.**, Copenhagen, v.89, p.157-64,1981.
14. CARLSSON, J. A numerical taxonomic study of human oral streptococci. **Odont. Revy.**, Malmo, v.19, p.137-60,1968.
15. CARLSSON, J. Metabolic activities of oral bacteria. *In*: THYLSTRUP, A. & FEJERSKOV, O. **Textbook of Cariology**, Copenhagen: Munksgaard, 1986, p.74-98.
16. CLARK, W.B.; BAMMANN, L. GIBBONS, R.J. Ability of *Streptococcus mutans* and a glucosyltransferase defective mutant to colonize rodents and attach to hydroxiapatite surfaces. **Infect. Immun.**, Washington, v.21, p.681-4, 1978.
17. COYKENDALL, A.L. Base composition of deoxyribonucleic acid isolated from cariogenic streptococci. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.15, p.365, 1970.
18. COYKENDALL, A.L. Four types of *S. mutans* based on their genetic, antigenic and biochemical characteristics. **J. Gen. Microbiol.**, Cambridge, v.83, p.327-38,1974.

19. COYKENDALL, A.L. Proposal to elevate the subspecies of *S. mutans* to species status based on their molecular composition. **Int. J. syst. Bact.**, Washington, v.27, p.26-30,1977.
20. CRITCHLEY, P.; WOOD, J.M.; SAXTON, C.A.; LEACH, S.A. The polymerization of dietary sugars by dental plaque. **Caries Res.**, Basel, v.1, p.112-29, 1967.
21. CURY, J.A. Uso do Fluor. *In*: BARATIERI, L. N. **Dentística. Procedimentos preventivos e restauradores**. 2.ed. Sao Paulo: Santos, 1992. 509p.
22. DAVEY, A.L. & ROGERS, A.H. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. **Archs. oral Biol**, Oxford, v.29, p.453 60, 1984.
23. de SOET, J.J.; TOORS, F.A.; de GRAAFF, J. Acidogenesis by oral streptococci at different pH values. **Caries Res.**, Basel, v.23, n.1, p.14-17, 1989.
24. de SOET, J.J.; HOLBROOK, W.P.; van AMERONGEN, W.E.; SCHIPPER, E.; HOMBURG, C.H.; de GRAAFF, J. Prevalence of *Streptococcus sobrinus* in relation to dental caries in children from Iceland and the Netherlands. **ASDC J Dent Child.**, v.57, n.5, p.337-42, 1990.

25. de SOET, J.J.; van LOVEREN, C.; LAMMENS, A.J.; PAVICIC, M.J.; HOMBURG, C.H.; TEM CATE, J.M.; de GRMFF, J. Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, Basel, v.25, p.116-22, 1991.
26. DEYLOFF, J.L. & SANDERS, C.C. Inhibition of *Streptococcus mutans* by human plaque flora. **J dent Res.**, v.59, n.11, p.1953-9, 1980.
27. DIBDIN, G.H. & SHELLIS, R.P. Analysis of the buffering systems in dental plaque. **J. dent. Res.**, Washington, v.67, p.438-446, 1988. *Apud Op. cit Ref.* 83.
28. DIBDIN, G.H.; DAWES, C.; MacPHERSON, L.M.D. Computer modeling of the effects of chewing sugar-free and sucrose-containing gums on the pH changes in dental plaque associated with a cariogenic challenge at different intra-oral sites. **J. dent. Res.**, Washington, v.74, p.1482-8, 1995.
29. DONOGHUE, H.D.; PERRONS, C.J. Effect of nutrients on defined bacterial plaques and *Streptococcus* C67-1 implantation in a model mouth. **Caries Res**, Basel, v.25, p.108-15, 1991.
30. DRUCKER, D.B. & MELVILLE, T.H. The classification of some oral streptococci of human or rat origin. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.16, p.845-53, 1971.

31. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F.
Colomitre method for determinations of sugars and related substances.
Analyt. Chem., Washington, v.29, p.350-6, 1956.
32. DUNNY, G.M.; BIRCH, G.H.N; CLEWELL, D.B. Isolation and
characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *S. mutans*. **J.**
Bacteriol., Washington, v.114, p.1362-4, 1973.
33. EMILSON, C.G. Prevalence of *S. mutans* with different colonial morphologies in
human plaque' and saliva. **Scand. J. dent. Res.**, Copenhagen, v.91, p.26-32,
1983.
34. EDWARDSSON, S. & KRASSE, B. Human streptococci and caries in hamsters
fed diets with sucrose or glucose. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.12, p.1015-6,
1967.
35. FABIO, U.; BONDI, M.; MANICARD, G.; MESSI, P.; NEGLIA, R. Production
of bacteriocin-like substances by human oral streptococci. **Microbiologica**,
v.10, n.4, p.363-70, 1987
36. FITZGERALD, R.J. Dental caries research in gnotobiotic animals. **Caries Res.**,
Basel, v.2, p.139-46, 1968.

37. FITZGERALD, R.J. & KEYES, P.H. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.61, p.9-19,1960
38. FITZGERALD, R.J. & KEYES, P.H. Ecologic factors in dental caries. The fate of antibiotic-resistant cariogenic streptococci in hamsters. **Amer. J. Pathol.**, Bethesda, v.42, p.759-72, 1963.
39. FITZGERALD, R.J.; JORDAN, H.V.; STANLEY, HR. Experimental caries and gingival pathologic changes in the gnotobiotic rat. **J. dent. Res.**, Washington, v.39, 923-35, 1960.
40. FU, J.; ZERO, K.M.; ANNE, K.M.; DASS, A. Effect of plaque thickness on glucose retention and acid productions. **J. dent. Res.**, Washington, v.70, p.1815, 1991.
41. GAWRONSKI, T.H.; STAAT, R.A.; ZAKI, H.A.; HARRIS, R.S.; FOLKE, L.E.A. Effects of dietary sucrose levels on extracellular polysaccharide metabolism of human dental. **J. dent. Res.**, Washington, v.54, p.881-890,1975.

42. GEDDES, D.A.M.; COOKE, J.A.; EDGARD, W.M.; JENKINS, G.N. The effect of frequente sucrose mouthrinsing on the induction *in vivo* of caries-likes changes in human dental enamel. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.23, p.663-5, 1978.
43. GIBBONS, R.J. & BANGHART, S.B. Syntesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.12, p.11-23, 1971.
44. GIBBONS, R.J.; BERMAN, K.S.; KNOETTNER, P.; KAPSIMALIS, B. Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule corming streptococci of human origin. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.11, p.549-60, 1966.
45. GIBBONS, R.J.; COHEN, L.; HAY, D.I. Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. **Infect. Immun.**, Washington, v.52, p.555-61, 1986.
46. GIBBONS, R.J. & NYGAARD, M. Syntesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming streptococci. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.13, p.1249-62, 1968.
47. GIBBONS, R.J. & van HOUTE, J. On the formation of dental plaques. **J. Periodont.**, Chicago, v.44, p.347-60,1973.

48. GRÖNROOSS, L.; SAARELA, M.; MÄTTO, J.; TANNER-SALO, U.; VUORELA, A.; ALALUUSUA, S. Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmission of bacteria from mother to child. **Infect Immun.**, Washington, v.66, n.6, p.2595-600, 1998.
49. GUGGENHEIM, B.; KONIG, K.G.; HERZOG, E.; MUHLEMANN, H.R. The cariogenicity of different dietary carbohydrates tested in rats in relative gnotobiosis with a streptococcus producing extracellular polysaccharide. **Helv. Odont. Acta.**, v.10, p.101 -13,1966.
50. GUGGENHEIM, B.; KONIG, K.G.; MUHLEMANN, H.R. Modifications of the oral bacterial flora and their influence on dental caries in rat. The effects of inoculating 4 labelled strains of streptococci. **Helv. Odontol. Acta.**, v.9, p.121-9, 1965.
51. GUGGENHEIM, B.; SCHROEDER, H.E. Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by cariogenic streptococci. **Helv. Odontol. Acta.**, v.11, p.131-52, 1962.
52. HARDIE, J.M. Oral streptococci. *In*: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; MOLT, J. G. **Bergey's Manual Systematic Bactereology**, vol. II. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. 337-68p.

53. HILMAN, J.D.; YAPHE, B.J.; JOHNSON, K.P. Colonization of the human oral cavity by a strain of *Streptococcus mutans*. **J dent Res.**, Washington, v.64, n.11, p.1272-4, 1985.
54. HIROSE, H.; HIROSE, K.; ISOGAI, E.; MIURA, H.; UEDA, I. Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth-surface caries increment. **Caries Res.**, Basel, v.27, p.292-7, 1993.
55. HUIS IN'T VELD, J.H.; DROST, J.S.; HAVENAAR, R. Establishment and localization of mixtures of *Streptococcus mutans* serotypes in the oral cavity of the rat. **J dent Res.**, Washington, v.61, n.10, p.1199-205, 1982.
56. HOLTZ, P.; GUGGENHEIN, B.; SCHIMD, R. Carbohydrates in pooled dental plaque. **Caries Res.**, Basel, v.6, p.103-21, 1972.
57. IGARASHI, T.; YAMAMOTO, A.; GOTO, N. Direct detection of *Streptococcus mutans* in human dental plaque by polymerase chain reaction. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.11, n.5, p.294-8, 1996.
58. IKEDA, T.; KURITA, T.; HIRASAWA, M. Suppression of *Streptococcus sobrinus* 6715(9) in plaques by *Streptococcus mutans* 32K(c). **J. oral Pathol.**, Copenhagen, v.17, p.471-4, 1988.

59. IKEDA, T.; KURITA, T.; HIDAKA, H.; MICHALEK, S.M.; HIRASAWA, M.
Low-cariogenicity of the tetrasaccharide nystose. **Gen. Pharmac.**, Exeter,
v.21, p.175-9,1990.
60. IMFELD, T.; HIRSCH, R.S.; MUHLEMAUN, H.R. Telemetric recording of
interdental plaque pH during different meal patterns. **Br. Dent. J.**, London,
v.144, p.40-45, 1978.
61. JENKINS, G.N. **Pellicle, plaque and calculus. The physiology and
biochemistry of the mouth.** 4.ed., Oxford: Blackwell, 1978, p.360-413
62. JORDAN, H.V. & KEYES, P.H. Na "*in vitro*" methods for the study of plaque
formation and carious lesions. **Archs. oral Biol.**, Oxford, 11: 793-801,1966.
63. JÜRGENSEN, C.A. & ARAUJO, W.C. Formação de placa bacteriana "*in vitro*".
Arq. Cent. Est. Fac. Odont., Belo Horizonte, v.4, p.87-93, 1967.
64. KEYES, P.H. Research in dental caries. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.76,
p.1357-73,1968.
65. KEYES, P.H. The infectious and transmissible nature of experimental dental
caries. Findings and implications. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.1,
p.304-20,1960.

66. KEYES, P.H. & FITZGERALD, R.J. Dental caries in the Syrian hamster IX. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.7, p.267:78, 1962.
67. KEYES, P.H. & FITZGERALD, R.J. Dental caries in the Syrian hamster X. The natural history of the disease in a single family. **Int. dent. J.**, Surrey, v.13, p.86-109.1963.
68. KITAMURA, K.; MASUDA, M.; KATO, K.; SOBUE, S.; HAMADA, S. Effect of bacteriocin-producing strain of *Streptococcus sobrinus* on infection and establishment of *Streptococcus mutans* on tooth surfaces in rats. **Oral microbiol. Immunol.**, v.4, n.2, p.65-70, 1989.
69. KIVELA, J.; PARKKILA, S.; PARKKILA, A.K.; RAJANIEMI, H. A low concentration of carbonic anhydrase isoenzyme VI in whole saliva is associated with caries prevalence. **Caries Res.**, Basel, v.33, n.3, p.178-84, 1999.
70. KÖHLER, B. & BJARNASON, S. Mutans streptococci, lactobacilli and caries prevalence in the 11 and 12 year old Iceland children. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v.15, p.332-35, 1987.
71. KÖHLER, B.; PETTERSSON, B.M.; BRATTHALL, D. *Streptococcus mutans* in plaque and saliva and the development of caries. **Scand J Dent Res.**, Copenhagen, v.89, n.1, p.19-25, 1981.

72. KOHLER, B.; BJARNASON, S.; FINNBOGASON, S. Y.; HOLBROOK, W.P. Mutans streptococci, lactobacilli and caries experience in 12-year-old Iceland urban children, 1984 and 1991. **Community Dent Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v.23, n.2, p.65-8, 1995.
73. KOPEC, L.K.; VACCA-SMITH, A.M.; BOWEN, W.H. Structural aspects of glucans formed in solution and on the surface of hydroxyapatite. **Glycobiology**, v.7, p.929-34, 1997.
74. KRASSE, B. Human streptococci and experimental caries in hamsters. **Archs. Oral Biol.**, Oxford, v.2, p.429-36, 1966.
75. KRASSE, B. Effects of dietaries on oral microbiology. *In*: HARRIS, R.S. **Art and science of dental caries research..** New York: Academic Press, 1968, p.111-20.
76. KRASSE, B. The effect of the diet on the implantation of caries-inducing streptococci in hamsters. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.10, p.215-21,1965.
77. LINDQUIST, B. & EMILSON, C.G. Dental location of *S. mutans* and *S. sobrinus* in humans harboring both species. **Caries Res.**, Basel, v.25, p.146-52,1991.
78. LOESCHE, W.J. **Cárie dental. Uma infecção tratável.** Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1993. 349p.

79. LOESCHE, W.J. & SYED, S.A. The predominant cultivable flora of carious plaque and carious dentine. **Caries Res.**, Basel, v.7, p.201-16, 1973.
80. MANDEL, I.D. Relation of saliva and plaque to caries. **J. dent. Res.**, Washington, v.53, p.246-71,1974.
81. MARGOLIS, H.C. An assessment of recent advances in the study of the chemistry and biochemistry of dental fluid. **J. dent. Res.**, Washington, v.69, p.1337-42,1990.
82. MARGOLIS, H.C.; ZHANG, Y.P.; VAN HOUTE, J.; MORENO, E.C. Effect of sucrose concentration on the cariogenic potential of pooled plaque fluid from caries-free and caries-positive individuals. **Caries Res.**, Basel, v.27, p.467-73, 1993.
83. MacPHERSON, L.M.D. & DAWES, C. Effects of salivary film velocity on pH changes in na artificial plaque containing *Streptococcus oralis*, after exposure to sucrose. **J. dent. Res.**, Washington, v.70, p.1230-4, 1991.
84. MacDOUGALL, W.A. Studies on the dental plaque. Levans and the dental plaque. **Aust. Dent. J.**, Saint Leonardis, v.67, p.1-5, 1964.
85. MENAKER, L. **Caries dentárias. Bases biológicas.** Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1984, 461 p.

86. OLIVEIRA, C.M. **Isolamento e caracterização de streptococcus de placa dental.** Tese (Doutoramento) – Instituto de Microbiologia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1974. 291p.
87. OLSSON, J.; van der HIJDE, Y.; HOLMBERG, K. Plaque formation in vivo and bacterial attachment in vitro on permanently hydrophobic and hydrophilic surfaces. **Caries Res.**, Basel, v.26, p.428-33, 1992.
88. ORLAND, F.J.; BLAYNEY, J.R.; HARRISON, R.W.; REYNIERS, J. A.; TREXLER, P.C.; ERVIN, R.F.; GORDON, H.A.; WAGNER, M. Experimental caries in germfree rats inoculated with enterococci. **J. Am. dent. Assoc.**, Chicago, v.50, p.259-72, 1955.
89. PERCH, B.; KJEMS, E.; RAVIN, T. Biochemical and serological properties of *S. mutans* from various human and animal sources. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, Copenhagen, v.82, p.357-70, 1974.
90. REBELO, M.A.B. **Avaliação bioquímica e cariogenicidade da placa dental formada na presença de sacarose ou glicose+frutose. Estudo *in situ*.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas, 1998.158p.
91. RÖLLA, G.; SHEIK, A.A.; CIARDI, J.E. Role of sucrose in plaque formation. **Scand. J. dent. Res.**, Copenhagen, v.93, p.105-11, 1985.

92. RUSSEL, R.R.B. Control of specific plaque bacteria. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v.8, p.285-90, 1994.
93. SCHEININ, A. The effect of various sugar on the formation and chemical composition of dental plaque. **Lnt. Dent. J.**, Surrey, v.21, p.302-21, 1971.
94. SKINNER, A.; CONNOLLY, P.; NAYLOR, M.N. The influence of the replacement of dietary sucrose by maltose on the formation and biochemistry of human dental plaque. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.27, p.603-8, 1982.
95. SKJORLAND, K.K.; RYKKE, M.; SONJU, T. Rate of pellicle formation in vivo **Acta Odont Scand.**, Oslo, v.53, p.358-62, 1995.
96. SKLAIR, I. L. & KEENE, H.J. A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *S. mutans*. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.19, p.1079-81, 1974.
97. SPOLIDORIO, D.M.P. Sorotipos de estreptococos grupo mutans e avaliação de parâmetros clínicos e microbiológicos entre escolares de diferentes classes sócio-econômicas. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas, 1997.131p.
98. STEPHAN, R.M. Intraoral hydrogen-ion concentrations associated with dental caries activity. **J. dent. Res.**, Washington, v.23, p.257-66, 1944.

99. TAKEHARA, T.; ITOH, M.; ANADA, N.; SAEKI, E. pH change in artificial dental plaque formed by glucosyltransferase and some oral bacteria during batch and continuous culture. **J. dent. Res.**, Washington, v.64, p.447-49, 1985.
100. TENOVUO, J.; JENTSCH, H.; SOUKKA, T.; KARHUVAARA, L. Antimicrobial factors of saliva in relation to dental caries and salivary levels of mutans streptococci. **J. Biol. Buccale**, Paris, v.20, p.85-90,1992.
101. van HOUTE, J.; UPESLACIS, V.N.; EDELSTEIN, S. Decreased oral colonization of *Streptococcus mutans* during aging of Sprague-Dawley rats. **Infect. Immun.**, Washington, v.16, p.203-12, 1977.
102. van HOUTE, J.; RUSSO, J.; PROSTAK, K.S. Increased pH-lowering ability of *Streptococcus mutans* cell masses associated with extracellular glucan-rich matrix material and the mechanisms involved. **J. dent. Res.**, Washington, v.68, p.451-9, 1989. *Apud* Op. cit Ref. 83.
103. van HOUTE, J.; SANSONE, C.; JOSHIURA, K.; KENT, R. Mutans streptococci and non-mutans streptococci acidogenic at low pH, and in vitro acidogenic potential of dental plaque in to different areas of the human dentition. **J dent Res.**, Washington, v.70, n.12, p.1503-7, 1991.

104. VENKITARAMAN, A.R.; VACCA-SMITH, A.M.; KOPEC, L.K.; BOWEN, W.H. Characterization of glucosyltransferase B, GtgC, and GtfD in solution and on the surface of hydroxyapatite. **J. dent. Res.**, Washington, v.74, n.10, p.1695-701, 1995.
105. WENNERHOLM, K.; BIRKHED, D.; EMILSON, C.G. Effects of sugar restriction on *Streptococcus sobrinus* in saliva and dental plaque. **Caries Res.**, Basel, v.29, p.54-6, 1995.
106. WHILEY, R.A. RUSSEL, R.R.B.; HARDIE, J.M.; BEIGHTON, D. *Streptococcus downey* sp. nov. for strains previously described as *S. mutans* serotype h. **Int. J. syst. Bact.**, Washington, v.38, p.25-9, 1988.
107. YAO, Y.; LAMKIM, M.S.; OPPENHEIN, F.G. Pellicle precursor proteins: acidic proline-rich proteins, staterin and statins, and their crosslinking reaction by oral transglutaminase. **J. dent. Res.**, Washington, v.78, n.11, p.1696-703, 1999.
108. ZINNER, D. O. & JABLON, J.M. Human streptococcal strains in experimental caries. *In*: HARRIS, R.S. **The art and science of dental caries research.** London: Academic Press, 1968.

109. ZHU, H.; WILLAX, M.D.P.; KNOX, K.W. A new species of oral *Streptococcus* isolated from Sprague- Dawley rats, *Streptococcus orisratti* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v.50, p.55-61, 2000.

APÊNDICE

Formação de placa bacteriana *in vitro*:

B.H.I.	3,7 g
Extrato de levedura	0,5 g
Água destilada	100 mL
Sacarose, glicose, frutose	10,0 g

Determinação da concentração de carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali

(DUBOIS et al., 1956):

HCl	0,5 M
NaOH	1,0 M

Supressão e recolonização da placa bacteriana *in vitro*:

BHI – ágar	5,2g
Estreptomicina	1,0 mg/mL
Rifampicina	0,1 mg/mL
Água destilada	100 mL