

PEDRO BERTOLINI

INCIDÊNCIA E CARACTERÍSTICAS DE MICRORGANISMOS ACIDOGÊNI-
COS NOS NICHOS MICROBIANOS DA CAVIDADE ORAL. SUAS RELA-
ÇÕES COM A CÁRIE DENTAL

Tese apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba
da Universidade de Campinas,
para concorrer ao título de
Livre Docente da Cadeira de
Microbiologia.

PIRACICABA - S.P.

1.969

1. INTRODUÇÃO	4
A. Lactobacilos	6
B. Leveduras	7
C. Estreptococos	9
D. Lactobacilos, leveduras, estreptococos	12
E. Formação de polissacarídeo intra e extracelular	13
2. PROPOSIÇÕES	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Seleção dos pacientes	19
3.2. Colheita do material dos nichos microbianos da cavidade oral	19
3.3. Meios de cultura para identificação de estreptococos	21
3.4. idem para leveduras	22
3.5. idem para lactobacilos	23
3.6. Caracterização das amostras isoladas e discriminação das demais provas	26
A. Identificação de estreptococos	26
B. Identificação das leveduras	27
C. Identificação dos lactobacilos	27
D. Inoculação e leitura do test de Snyder	28
E. Formação de polissacarídeo intracelular	29
F. Formação de polissacarídeo extracelular	29
G. Obtenção de placa "in vitro"	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Identificação e incidência dos microrganismos	30
A. Lactobacilos	30
B. Leveduras	32
C. Estreptococos	34
4.2. Resultados obtidos com a semeadura de material dos nichos microbianos no meio de Snyder	40

4.3. Formação de polissacarídeo intra- celular.....	42
4.4. Formação de polissacarídeo extra- celular.....	43
4.5. Formação de placa " in vitro".....	43
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
8. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA.....	64

1. INTRODUÇÃO

Em 1.890, MILLER, estabeleceu a sua teoria quími-co-parasitária para explicar a origem da cárie dental. Segundo a mesma os microrganismos presentes na boca transformam os açúcares através das suas enzimas em ácido láctico; este, age sobre o esmalte do dente determinando sua descalcificação.

Esta afirmação evidenciou para os pesquisadores, uma nova senda de trabalho - o estabelecimento da especificidade microbiana. Desta maneira, passaram os investigadores a estudar as variações da flora oral.

Aos estudos qualitativos dos diferentes gêneros de microrganismos da cavidade oral, sucedeu-se a determinação quantitativa dos mesmos. Tornou-se possível, desta forma, estabelecer os tipos predominantes das várias regiões da boca, ou seja, a flora principal dos "nichos" ecológicos, como o sulco gengival, placa dental, dorso da língua e saliva. Neste particular, dois métodos foram usados: um através de contagem microscópica em esfregaços corados, outro, a contagem de colônias em meios de cultura seletivos e não seletivos. Com estes recursos foi possível caracterizar alguns dos elementos bacterianos presentes em número elevado na língua, sulco gengival e placa dental e ainda suas variações face aos processos cariosos ou doenças periodontais.

Ordinariamente a saliva era usada para uma soma considerável de pesquisas. Tanto é que para se determinar a atividade cariosa eminente criaram-se três testes: a) teste de FOSDICK (1.937); b) contagem de lactobacilos em meio de ágar-çuco-de-tomate (HADLEY, 1.933); c) teste colorimétrico de SNYDER (1.940). Em todos eles semeava-se a saliva como substância contendo os organismos acidogênicos responsáveis pelo aparecimento da cárie e ain

da como fonte representativa de uma flora que seria semelhante a da placa. Contudo, KRASSE (1.954), provou que esse procedimento não era correto. Investigando a distribuição dos estreptococos facultativos nas várias regiões da boca, sobretudo o Str.salivarius, concluiu que este organismo, facilmente reconhecível pela capacidade de formar levana extracelular, perfazia 67% dos estreptococos facultativos presentes na língua, 49% dos encontrados na saliva e 1% dos presentes na placa. Seus achados confirmaram-se com os de GIBBONS e colab. (1.963), estabelecendo-se pois, que os germes da saliva originam-se da língua e não da placa, motivo pelo qual a saliva não pode ser empregada nos estudos da flora da placa dental. Este termo, placa dental, foi proposto por BLACK (1.898), para designar "massas de germes" a que se referiu WILLIAMS, em 1.897.

A placa dental está representada por uma película de espessura variável, fortemente aderida à cutícula ou à superfície do esmalte; é constituída por restos alimentares, muco, células de descamação e sobretudo, por grande número de microrganismos. Segundo STRALFORS (1.950), é possível cultivar por gramo de placa o número fabuloso de 4×10^{10} de germes, sendo que os estreptococos, Neisseria e Veillonella, foram encontrados na quantidade de 10^{10} germes viáveis; microrganismos filamentosos, difteroides, fusobactérias e bacteróides, foram cultivados em número aproximadamente igual aos anteriores (HEMMINGS e colab. 1.946); outras bactérias, como estafilococos, lactobacilos e leveduras foram isolados em número bem menor (KRASSE, 1.954; STRALFORS, 1.950).

Os conhecimentos adquiridos até os dias atuais, principalmente as verificações feitas em animais livres de germes (germ-free animals) ou em gnotobíotas e convencionais, permitem afirmar que existe uma correlação da placa com o aparecimento do processo carioto. Certos fatos falam em favor desta

assertiva, assim, a placa está sempre presente nas superfícies que se tornam cariadas; nesta situação, encerra elevado número de germes acidogênicos, os quais determinam pelo metabolismo de carboidratos, acentuada queda do pH em certas zonas da superfície dental.

A - Lactobacilos

Os lactobacilos, microrganismos dotados dessa característica, foram intensamente estudados sob todos os aspectos.

Os inúmeros trabalhos mostraram existir uma estreita correlação entre o número desses microrganismos com a incidência de cárie. Já em 1.922, RODRIGUEZ afirmava que membros do grupo lactobacilos estavam sempre presentes em cáries dentais. Conseguiu reproduzir o processo carioso, experimentalmente, imergindo dentes estéreis em culturas de B. acidophilus.

Estudando a presença de lactobacilos em 1.300 crianças, BUNTING (1.928), verificou estreita correlação com as cáries presentes. Comparando o exame clínico com o teste colorimétrico de Snyder e contagem de lactobacilos, GALE (1.951) referiu haver uma estreita correlação entre eles.

Excelente trabalho foi feito, neste sentido, por KRASSE e colab. (1.955); os autores observaram 22 pacientes com atividade de cárie cuja média de idade média era de 22,4 anos e 18 indivíduos cárie inativos (média de idade de 23,1 anos), no sentido de estabelecer um paralelo entre a contagem de lactobacilos, teste de Snyder e Wach test. Conseguiu bons resultados com a observação clínica e a contagem dos referidos germes, pequena relação com o teste de Snyder e nenhuma com o último teste referido. Em 1.956, GREEN & DODD, realizaram culturas de saliva de 25 indivíduos cárie ativos e 25 cárie inativos e contagens dos microrganismos crescidos, inclusive leveduras. Verificou que os únicos germes encontrados em meio -

ria significativa, foram os lactobacilos nos pacientes com a atividade de cárie. Referiu ainda a conclusão de que a saliva das pessoas imunes à cárie inibia o crescimento de lactobacilos "in vitro", o que não acontecia com a dos cárie-suscetíveis. Observações semelhantes foram realizadas por BAIRD-PARKER & colab. (1.958) em 44 pacientes do Instituto de Saúde Pública de Pavia com baixo número de cáries e em 106 de Nápoles com elevado número dessas lesões; nestos últimos, encontraram poucos lactobacilos mas uma diferença significativa entre os grupos com alto e baixo número de cáries.

Este último grupo tinha incidência diminuta de L. fermenti e nenhum lactobacilo foi isolado de pessoas livres de cárie. Ao lado das pesquisas feitas nos moldes das que citamos, outras vieram indicar resultados contrários. Assim, em 1.948, BOYD & colab., fizeram exame clínico de 200 crianças e contagem de lactobacilos, relacionando-os em contagem inicial e posterior a 9 e 21 meses; concluíram que a contagem dos germes citados não é significativa como diagnóstico de atividade de cárie. As mesmas conclusões chegaram BOYD & WESSELS (1.951), num ensaio que fizeram com 200 crianças, com 13 a 20 anos não encontrando, porém, relação entre as contagens de lactobacilos e cárie.

B - Leveduras

As leveduras também foram relacionadas com os processos de cárie por GOADBY (1.910), por sua capacidade de produzir grande quantidade de ácido láctico.

Trabalhando com pessoas suscetíveis e imunes à cárie (HATTON, 1.937), conseguiu, cultivando material de raspados dentais, em caldo glicosado de pH 6,8 e 5,5 os seguintes resultados:

	Caldo glicosado		Caldo glicosado	
	pH = 6,8		pH = 5,5	
	Imunes %	Suscetíveis %	Imunes %	Suscetíveis %
<u>L.acidophilus</u>	25	65	20	66
Leveduras	34	37	20	59

Excluímos os outros germes citados pelo autor, porque nosso objetivo é mostrar, como se pode deduzir da observação do quadro anterior, que em pH ácido o número de agostas de leveduras nos suscetíveis eleva-se, consideravelmente, aproximando-se do percentual dos bacilos acidófilos.

EULER(1.943), embora admitindo que os lactobacilos podem ser os agentes etiológicos da cárie, lembram que também as leveduras são capazes de determinar "in vitro", potencial ácido. Discutindo as várias teorias da cárie, SCHULERUD(1.950), refere que as leveduras podem ser os organismos primariamente responsáveis pela lesão e depois os lactobacilos. Os ácidos resultariam da atividade simbiótica da flora oral.

Segundo LILIENTHAL(1.931), a ação simbiótica das leveduras na origem da cárie não é conhecida. Candida albicans pode aumentar a produção de ácido por lactobacilos, mas evidências de uma possível participação na cárie não foi bem estabelecida. Analizando o material colhido de cáries de dentes de 200 europeus e de número igual de africanos (negros bantú), VAN RIEZEN e VAN der WALT(1.955), isolaram 16 espécies de leveduras, sendo 56,5 % no primeiro grupo e 38,5% nos não europeus. Atribuíram essa maior diferença a um consumo mais elevado de açúcar por este último grupo. Ainda tem sido salientada sua ação favorecedora no metabolismo dos carboidratos pelos lactobacilos, com formação de maiores quantidades de ácido, em menor espaço de tempo, motivo pelo qual são as leveduras igualmente

responsabilizadas pelos processos de cárie dental. Essas observações foram confirmadas por YOUNG & colab. (1.956), com seus trabalhos sobre a ação concomitante de amostras de C. albicans e Lactobacillus acidophilus, os quais, em culturas mistas, fazem baixar o pH do meio, após 48 horas, bem mais do que quando esses germes atuam isoladamente.

WILSON & colab. (1.959), mostraram que o L. casei não utiliza hexosefosfato para a produção de ácido lático; fazem-no contudo, quando em presença de leveduras, por efeito complementar de suas atividades enzimáticas uma vez que aquelas favorecem o aumento da atividade fosfatásica dos lactobacilos.

BARTELS & colab. (1.962), cultivaram 320 amostras de saliva de 160 indivíduos de 20 a 30 anos, sendo metade das salivas obtidas através de mastigação pela parafina e a outra metade. Usaram o meio de Litman, obtendo 40% de leveduras, das quais, 75,6% foram classificadas como Candida sp e 60% como C. albicans.

C - Streptococos

Também responsabilizados pelo mecanismo produtor de cárie, desde há muito tempo, estão sendo estudados mais cuidadosamente, nos dias atuais. Foram isolados de cáries superficiais e profundas por HARTZELL & HENRICH, em 1.917, que lhes atribuiu a responsabilidade do processo carioso por sua capacidade necrozante e poder invasor. Ainda de cáries incipientes foram isolados Streptococos denominados de Str. mutans, por CLARKE (1.924), em virtude da sua capacidade de produzir ácido, rapidamente, fazendo o pH baixar de 7,0 para 4,2 em 24 horas. Estes trabalhos foram posteriormente confirmados por MACLEANS (1.927), que estabeleceu mesmo uma diferenciação entre o Str. mutans e o Bacillus acidophilus, baseada na variação de fermentação de diferentes açúcares.

A quantificação destes germes foi realizada por alguns pesquisadores, dentre eles, BIBBY & VAN KESTEREN (1.939) estudando as quantidades de bactérias da saliva, verificaram que os estreptococos estavam presentes em maior número que os outros organismos e eram capazes de fermentar os carboidratos com mais rapidez que os lactobacilos e por isso mesmo de veriam desempenhar papel preponderante na etiologia da cárie.

A produção de cárie "in vitro" foi empregada por alguns investigadores como método de estudo para demonstrar o potencial cariogênico de alguns germes. Foi assim que, isolando Str. viridans de dentes cariados, HAMMOND (1.939), conseguiu provar a sua participação no processo carioso. Para isso inoculou a referida bactéria em tubos contendo dentes estéreis mergulhados em caldo glicosado de pH 7,0; as medidas do pH mostraram queda sensível para 4,4 a 4,8 em superfícies dos dentes com cárie após 6 meses.

Algumas amostras de estreptococos apresentam diferenças na velocidade de produção de ácidos e às vezes parecem especialmente adaptados para produzir ácidos na presença de esmalte e dentina, pois há sempre, neste caso, uma relação direta entre a quantidade de dente desmineralizado e a acidez titulada (BIBBY & coalb., 1.942).

Os Str. salivarius foram objeto de um estudo muito bem feito por SHIENE, em 1.951, onde o autor verificou que a sua incidência é proporcional ao número de lesões cariosas; que o pH é baixado para 4,5, aproximadamente, e que convertendo carboidratos a ácido lático determina erosões do dente "in vitro".

No mesmo sentido foram orientadas as buscas de MORRIS (1.954), que observou alguns fatos ligados ao Str. salivarius; suas amostras isoladas a partir de dentes cariados atacavam grande número de açúcares, mas não conseguiu estabelecer diferenças nas propriedades acidúricas e acidogênicas conforme a pro-

cedência; observaram Str. equinus e Str. mitis em bôcas com baixo índice de cárie e nas bôcas com cárie ativa encontrou frequentemente Str. faecalis.

Os estreptococos, pelo seu elevado número na flora oral e ainda por serem acidogênicos apresentam evidências de desempenharem papel importante no mecanismo da cárie, segundo as afirmações de BIBBY, em 1.956.

Através de raspagens feitas em dentes hígidos e ao redor de outros com cárie, conseguiu YARDENI e colab. (1.959), separando o material assim obtido isolar estreptococos microaerófilos em culturas puras, principalmente das regiões que tendiam a se tornarem cariadas. Algumas observações feitas em 1.960, por FITZGERALD & KEYES, mostraram resultados significativos. Isolando diversos microrganismos de hamsters com cárie e sem cárie, infectaram com os mesmos, animais resistentes à cárie, alimentando-os com dieta cariogênica. Tiveram a oportunidade de observar o aparecimento de cárie apenas nos animais infectados com estreptococos isolados de animais com atividade cariiosa.

Num estudo que fez para verificar a produção de ácidos por lactobacilos, estreptococos e outras bactérias orais, SIMS em 1.965, observou que essa característica variava grandemente em função sobretudo da sua concentração numa superfície e como os estreptococos alcançavam concentrações elevadas, concluiu que eles eram os responsáveis pelo ataque inicial do esmalte. Algumas amostras de estreptococos (amostra AHT), isoladas de cáries dentais humanas, podem segundo os trabalhos dos investigadores ZINNER & colab. (1.965 a), com animais de laboratório, determinar cáries em "hamsters". Observações semelhantes foram feitas por KRASSE (1.966); o autor isolou de dois pacientes cárie ativos, estreptococos morfológica e bioquimicamente semelhantes àsquelas das amostras "indutoras" de cárie em "hamsters"; introduzindo esses estreptococos na cavidade oral dos

referidos animais, alimentados com dieta cariogênica, obteve a formação de lesão cariosa. Ainda trabalhando no mesmo sentido, GIBBONS & colab. (1.966), reproduziram cáries em ratos gnotobiotos com estreptococos isolados de lesões humanas; verificou ainda que nem todos os estreptococos presentes em número elevado nas lesões humanas cariosas são cariogênicos em culturas puras.

De placas dentais humanas, DE STOPPELAR & colab. (1.967), isolaram germes semelhantes aos Str. bovis e Str. sanguis; para estes autores, os estreptococos "indutores de cárie" descritos por KRASSE (1.966), bem como os estreptococos dos Grupos I (sub-grupo II) e II de CARLSSON (1.967 a), este correspondente ao Str. mutans de CLARKE (1.924), possuem características comuns com o Str. bovis.

D - Lactobacilos, Leveduras e Estreptococos.

Alguns autores procuraram fazer um estudo conjunto da incidência dos três germes citados para relacionar a presença dos mesmos com o aparecimento de cárie.

Neste sentido, WILLIAMS & colab. (1.950), pesquisaram a incidência de enterococos, lactobacilos e leveduras na saliva humana encontrando entre os primeiros, a seguinte ocorrência: Str. faecalis (82,2%), Str. liquefaciens (11,1%) e Str. zymogenes (6,6%). As análises revelaram que altas contagens de lactobacilos e baixas contagens de leveduras foram obtidas quando os enterococos estavam presentes. Os dados, entretanto, não revelaram que os enterococos pudessem servir como índice de presença ou ausência de cárie dental, nos pacientes dos quais a saliva foi obtida. Em investigação das relações entre o número de lactobacilos, Candida e estreptococos de material de saliva e placa, levada a efeito em 2 grupos de pacientes, um cárie ativo, o outro cárie-inativo, KRASSE (1.953), obteve os se -

guintes resultados: o grupo cárie-ativo mostrou grande número de lactobacilos e Candida na saliva, bem como em material de placa e um número maior de estreptococos na placa que o grupo inativo; não encontrou diferenças entre os grupos cárie-ativos e inativos com relação ao número de estreptococos na saliva ou a incidência de Str. salivarius; quando o número de lactobacilo ou Candida era grande em material de placa, êlo e ra também elevado na saliva; em relação aos estreptococos, tal relação não foi encontrada; ainda, o material de placa e a saliva mostraram grandes diferenças nas contagens de lactobacilos, Candida e estreptococos.

Buscando estabelecer uma relação entre contagens de lactobacilos e leveduras e o estado clínico de superfícies dentais IYER (1.952), não encontrou correspondência entre a incidência de cáries e as contagens dos germes estudados.

Dos dados que podemos colher na literatura especializada verifica-se que há uma grande discrepância nos resultados encontrados pelos vários autores. Por isso mesmo, resolveu nos fazer verificações semelhantes para constatar ou não a reprodutibilidade de alguns desses fatos em nosso meio, com pacientes de hábitos alimentares diferentes dos de outras regiões e condições sócio-econômicas sofríveis. Da quantificação de estreptococos, lactobacilos e leveduras nos diferentes nichos da boca, ser-nos-á possível estabelecer uma segunda proposição que é a de conhecer as regiões de prevalência das leveduras, ou seja, a determinação do seu nicho ecológico, sobre o qual até hoje são escassas as informações, mesmo sabendo-se que estes fungos dão origem a processos patológicos muitas vezes graves.

E - Formação de Polissacarídeo Intra e Extracelular.

As demais proposições do nosso trabalho foram sugeridas por uma revisão das pesquisas de inúmeros investigadores,

feitas no sentido de explicar a etiologia da cárie dental. De fato, uma das objeções à teoria de MILLER (1.890), foi a observação do fato de que as bactérias produtoras de ácido eram encontradas tanto em superfícies dentais de indivíduos cárie ativos como naqueles que não possuíam cáries. Posteriormente, com a aplicação de técnicas para a determinação da concentração hidrogênio-iônica na placa e saliva, foi possível relacionar variações de pH com o aparecimento de cárie. Estabeleceu STEPHAN (1.944), que existe uma diferença quantitativa na intensidade e duração da acidez produzida por decomposição de carboidratos nos dentes de indivíduos livres e portadores de cárie. Ainda segundo o autor, as massas bacterianas da placa com uma concentração máxima de enzimas em pequeno espaço, diante de pequena atividade tampão, produzem ácidos com grande velocidade e conseqüentemente uma queda elevada de pH. Além da ação bacteriana, outras causas controlam o pH da placa, como o fluxo e a capacidade tampão da saliva, as espécies e quantidades de bactérias presentes, bem como a atividade acidogênica e ainda as quantidades de carboidratos ingeridas e mais especialmente os retidos na boca e placa dental. A maneira pela qual esses fatores agem isoladamente ou combinados ainda é obscura. O que se sabe é que há diferenças entre as placas de indivíduos cárie-resistentes e cárie suscetíveis. Neste sentido é interessante citar as conclusões de BLAYNEY & colab. (1.936) mostrando diversificações da flora microbiana na placa dos dois tipos de pacientes citados. Em 1.950, STRALFORS, mostrou que um aumento na concentração de bactérias está associado com aumento na formação de ácido por unidade de tempo. Concluiu que a concentração de bactérias e o coeficiente de difusão dos ácidos nas placas é de importância decisiva na ocorrência ou não da descalcificação. Como conseqüência dessa variação de flora bacteriana provavelmente

te ocorrem condições diferentes no metabolismo dos carboidratos e o tempo de ação dos produtos resultantes, com a superfície do dente. Sabe-se que a lavagem da boca com solução de glicose produz queda do pH a menos de 5,1. No entanto, para que se estabeleça a descalcificação do esmalte é necessária a permanência da acidez por longos períodos de tempo. Isso é possível com a ingestão frequente de açúcares através de alimentos ricos em carboidratos ou através da retenção de polissacarídeos na superfície do esmalte; em favor desta última ponderação falam bem claro as pesquisas de GIBBONS & colab. (1.955) e DOETSCH & colab. (1.957). Segundo estes autores, bactérias capazes de sintetizarem polissacarídeo intracelular do tipo glicogênio-amilopectina, em presença de carboidratos, podem metabolizá-lo quando o açúcar exógeno foi consumido mantendo assim a acidez residual por período de tempo maior nos indivíduos sujeitos à cárie do que nos sem cáries. Ainda em favor desta hipótese corroboram as afirmações de GIBBONS & SOCRANSKY (1.962), que admitem a possibilidade do polissacarídeo intracelular sintetizado por algumas bactérias concorrer para o estabelecimento da cárie. Estudando microrganismos de placas, dotados dessa propriedade, relacionaram estreptococos difteróides e fusobacterium, como capazes de metabolizarem o polissacarídeo intracelular formado, com produção de ácido láctico. Placas de pacientes cárie ativos continham microrganismos fortemente iodofílicos em proporção mais elevada que a queles de placas de indivíduos sem cáries. Para estudar a maneira pela qual as bactérias acumulam polissacarídeos (GIBBONS 1.962), empregou uma amostra de Str. mitis. Verificou a ocorrência da elaboração e armazenamento de grandes quantidades de polissacarídeos em presença de açúcar fermentescível, como a glicose, mas sob condições de crescimento limitado. Em virtude da metabolização do carboidrato produziram-se gran-

des quantidades de ácidos, suficientes para baixar o pH a menos de 6,0, ácidos que se manteve por várias horas, mesmo diante de um fluxo contínuo de solução tampão de pH 7,0. Na ausência do fluxo da solução tampão o pH produzido estava abaixo de 5,0. Estes achados sugerem que os polissacarídeos armazenados pelos organismos possam ser os responsáveis pela manutenção do pH baixo nas placas quando o carboidrato exógeno foi consumido.

Uma das proposições do nosso trabalho decorre da observação feita por GIBBONS (1.962). Verificou o autor, que 54% dos microrganismos cultivados de placas dentais de indivíduos com cáries eram capazes de armazenar grandes quantidades de polissacarídeos enquanto que somente 29% de germes de placas de cárie inativos faziam-no. Seria interessante, pois, que os microrganismos que teremos oportunidade de isolar e identificar fossem investigados quanto a possibilidade de verificar se sintetizam o referido carboidrato intracelular, cuja função primordial já foi citada.

Se de um lado esse mecanismo é significativo, outro não é menos importante e refere-se à produção de polissacarídeo extracelular por parte de organismos orais o que parece estar intimamente ligado à própria formação da placa, mecanismo este ainda obscuro. Admitem os autores que a mucina salivar que banha as superfícies dentais, constitui o início da placa; pela desnaturação superficial da mucina resulta uma camada de proteínas que adere ao esmalte do dente; em algumas áreas dessa camada prendem-se bactérias, restos alimentares, células de descamação e leucócitos; a produção local de ácido determina a precipitação de mucóide adicional e o processo se repete, do que resulta o espessamento da placa dental. Neste processo de formação verifica-se atividade coadjuvante de algumas bactérias que produzem polissacarídeo extracelular, semelhante à dextrana, sintetizado primariamente a partir da

sacarose. Alguns dados importantes sobre a dextrana. Um dos principais constituintes da matriz da placa dental foram estabelecidos por GIBBONS & BANGHART (1.967). Assim, constataram a capacidade da dextrana aderir à hidroxiapatita e portanto aos dentes, mesmo quando banhados pela saliva na boca; ainda mais, é relativamente resistente à hidrólise produzida pela flora oral mista; forma complexo insolúvel quando incubada com saliva, fato este que impede que as placas dentais se desmanchem e desapareçam quando lavadas.

Um regime rico em sacarose determina um aumento do volume de placas dentais, o que não ocorre com o uso da glicose (CARLSON & EGELBERG, 1.965). Sugeriram os autores que as bactérias formadoras de polissacarídeo extracelular poderiam participar do processo. Estreptococos isolados de cáries humanas por GIBBONS & colab. (1.966) e que mostraram-se cariogênicos para ratos gnotobíóticos, formam grandes quantidades de polissacarídeo intracelular e ainda extracelular. Esses microrganismos cariogênicos cultivados em caldo-sacarose crescem aderidos às paredes do tubo de cultivo formando massas gelatinosas. Cáries em ratos gnotobíóticos puderam ser produzidas por estreptococos (amostra S32) isolados de boca humana, produtores de levan e estreptococos produtores de dextrana (amostra SEEL) isoladas do sangue de paciente com endocardite bacteriana subaguda (GIBBONS & BANGHART, 1.968).

Parece-nos, pois, que a capacidade de produzir dextranas, torna os microrganismos dotados dessa propriedade, capazes de formar a placa dental. Tornou-se, pois imprescindível, introduzir no conjunto das nossas investigações, um esquema de trabalho que nos permitisse determinar a formação de polissacarídeo extracelular por parte dos germes estudados e consequentemente a formação de placas "in vitro", em meio hiper-sacarosado.

2. PROPOSIÇÕES

2. 1. Determinar quantitativamente o número de estreptococos, lactobacilos e leveduras presentes, no sulco gengival, dorso da língua, placa dental e na saliva.
2. 2. Correlacionar essas determinações quantitativas dos vários nichos com o teste colorimétrico de Snyder.
2. 3. Estudar as espécies dentro dos gêneros investigados.
2. 4. Verificar, dentre os microrganismos estudados, quais os dotados da capacidade de produzir polissacarídeo intracelular.
2. 5. Observar quais os que formam placa "in vitro", e consequentemente polissacarídeo extracelular. Isolar e purificar esse carboidrato.

3. Material e Métodos

3.1. Seleção dos Pacientes

O material a ser examinado foi colhido de crianças cuja idade variava entre 7 e 14 anos de idade. Suas condições alimentares eram as da classe mediana para a pobre, sem hábitos de escovagem dos dentes, com uso de carboidratos relativamente elevado. Metade delas apresentava grande número de cáries e a outra, ausência total desse processo.

3.2. Colheita do material dos nichos microbianos da cavidade oral.

Placa dental: os dentes foram isolados de possível contaminação pela saliva com roletes de algodão colocados segundo a técnica comum de dentisteria. Usando-se uma colher de dentina previamente confeccionada para obter-se 1 mg de placa, raspavam-se as faces vestibular e lingual dos molares e a labial dos incisivos e caninos, para obter uma mistura representativa da flora das placas. Nas crianças com indícios de cárie ativa colhemos o material próximo às cavidades dos dentes vizinhos aos cariados.

Sulco gengival: com a mesma cureta usada anteriormente, removia-se a massa branca e viscosa, não calcificada, introduzindo-a sob o sulco gengival.

Dorso da Língua: Esfregávamos o "swab" no dorso da língua. O material era resuspenso em 1 ml de solução tampão e com ela fazíamos as demais diluições.

Saliva: a saliva era colhida em tubos de ensaio, largos e previamente esterilizados.

O material obtido de placa e sulco era depositado em pequenos retângulos de papel de alumínio esterilizado e logo a seguir, pesado em balança Mettler, tipo H-15. Depois do pesado removia-se o material para vidros vazios de penicilina com -

tendo solução tampão de fosfato 0,067 M de pH 7,2 com 0,05% de extrato de levedura, segundo as indicações de LITTLETON & colab. (1.967); os vidros continham pérolas de vidro para promover a homogeneização do material. A seguir, eram feitas novas diluições de modo a se obter as seguintes concentrações:

- a) 1 mg de placa em 10 ml de solução tampão, para se partir da diluição 10^{-4} , continuando até 10^{-8}
- b) idem para material de sulco gengival
- c) 1 ml de saliva era semeado em 9 ml de solução tampão de modo a proporcionar concentração inicial de 1/10, continuando-se até 10^{-8}
- d) O material colhido do dorso da língua era homogeneizado em 1 ml de tampão, dando diluição inicial de 1:1 e continuando-se até 10^{-8} .

As diferentes diluições foram semeadas em meios seletivos para estreptococos (mitis-salivarius ágar), para lactobacilos (S.L. Rogosa) e ágar Sabouraud-glicose, com 20 U. de penicilina e 40 ug de estreptomycin. A quantidade de cada diluição semeada foi sempre de 0,1 ml, com auxílio de alça de vidro flambada, tendo-se o cuidado de cobrir toda a superfície do meio. A incubação se fez em aerobiose, com exceção para os estreptococos que foi feita em microaerofilia, com tensão de CO_2 . A temperatura usada foi de $37^{\circ}C$. e as colônias examinadas após 4 a 5 dias de crescimento. As colônias foram contadas com auxílio de microscópio estereoscópico e aumento de X 8; a seguir, transferiam-se as colônias características dos diferentes germes para novas placas, onde eram semeados através de estrias para se obter culturas puras; estas, eram transferidas para caldo triptose-fosfato com a finalidade de conservá-las e ao mesmo tempo servirem como "inoculum", para as reações bioquímicas de caracterização.

3.3. Meios de Cultura

As quantidades indicadas são para 1 litro de meio.

a) Ágar "Mitis-Salivarius"

Trypticase	10,0 g
Polypeptona	10,0 g
Glicose	1,0 g
Sacarose	50,0 g
K ₂ HPO ₄	4,0 g
Azul Trypan	0,075 g
Cristal violeta	0,0008 g
Ágar-ágar	20,0 g

Acertar o pH a 7,2, esterilizar a 121°C por 15 minutos, resfriar a 50°C e adicionar uma solução de telurito de potássio a 1% estéril (1 ml). Distribuir em placas de Petri.

b) Caldo Triptose-Fosfato

Usamos o meio desidratado do Laboratório Difco, "Tryptose Phosphate Broth", segundo as indicações do fabricante. Distribuir em tubos na quantidade de 5 ml.

c) Caldo com Cloreto de sódio a 4% e a 6,5%

Extrato de carne	1,0 g
Proteose-peptona nº 3	10,0 g
Glicose	10,0 g
Cloreto de sódio (concentr. desejada)	
Vermelho fenol	0,018 g

Acertar o pH a 7,4, distribuir em tubos e esterilizar a 121°C por 15 minutos.

d) Meio de leite com azul de metileno.

Leite em pó desnatado, a 10%; distribuir 9 ml em tubos. Esterilizar a 115°C por 20 minutos. Antes do uso adicionar 1 ml da solução de azul de metileno a 0,1 ou 0,01%, estéril.

c) Hidrólise do amido (Meio para verificação da)

Tryptona	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
K_2HPO_4	2,0 g
Amido	3,0 g
Glicose	0,5 g
Ágar-ágar	15,0 g

Acertar o pH a 7,2, esterilizar a $121^{\circ}C$ por 15 minutos e distribuir em placas.

f) Caldo sacaroso a 5%

Tryptose	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
K_2HPO_4	5,0 g
Sacarose	50,0 g

Acertar o pH a 7,2, dissolver os componentes, distribuir cerca de 5 ml em tubos, esterilizar a $121^{\circ}C$ por 15 minutos.

3.4. Meios de Cultura para Identificação de Leveduras

E) Fragmentos de cenoura

Fatias de cenoura cortadas longitudinalmente, foram colocadas em tubos largos com pequena porção de salina e esterilizadas a $121^{\circ}C$ por 15 minutos. As replicações eram feitas numa das faces em bisel; a incubação se fez a $25^{\circ}C$.

H) Fermentação de açúcares (Zimograma)

Usamos água de levedura autolizada, com 2% dos açúcares a serem estudados, mais azul de bromotimol a 0,04%. Incubação e leitura diária pelo tempo de 15 dias.

i) Utilização de Fontes de Carbono e Nitrogênio (Auxanogramas)

Para as fontes de carbono, empregamos o seguinte meio:

Sulfato de amônio	0,1 g
Fosfato ácido de potássio	0,1 g
Sulfato de magnésio	0,1 g

solução de ágar lavado 100,0 ml

Para a utilização de fontes nitrogenadas foi usado o meio básico seguinte:

Glicose	2,0 g
Fosfato ácido de potássio	0,1 g
Sulfato de magnésio	0,05 g
Solução de ágar lavado a 4%	100,0 ml

3.5. Meios de Cultura para Identificar Lactobacilos.

j) S.L. Rogosa (Selective Lactobacillus Rogosa)

Tryptona	10,0 g	Fosfato monopotássico	6,0 g
Extrato levedura	5,0 g	Sulfato de magnésio	0,57 g
Dextrose	10,0 g	Sulfato de manganês	0,12 g
Arabinose	5,0 g	Sulfato de ferro	0,03 g
Sacarose	5,0 g	"Tween 80"	1,0 g
Acetato sódio	15,0 g	Ágar-ágar	15,0 g
Citrato amônio	2,0 g		

Adicionar água e derreter os ingredientes com o ágar; adicionar na hora do uso, 1,23 ml de ácido láctico, procedendo-se à semeadura em profundidade, em virtude do fato de que o acetato de sódio se concentra na superfície do meio, impedindo o crescimento dos lactobacilos quando a semeadura é feita por esfregão na superfície.

k) Meio de ágar Suco-de-tomate

Suco de tomates (parte sólida de 400 ml)	20,0 g
Peptona	10,0 g
Glicose	5,0 g
Leite peptonizado	10,0 g
Ágar-ágar	15,0 g

Derreter e adicionar ácido láctico que suficiente para baixar o pH a 5,0. Esterilizar a 121°C por 15 minutos e distribuir em placas.

l) Meio líquido para as provas de fermentação

Trypticase	10,0 g
Extrato levedura	3,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g

Acertar o pH a 7,2, esterilizar a 121°C por 15 minutos, tendo-se o cuidado de colocar antes da esterilização, tubos de Durham invertidos para coleta de gás; o substrato fermentável é adicionado após esterilização em Seitz, na concentração de 1%. Como indicador empregamos púrpura de bromocresol.

m) Meio de cultivo para hidrólise do hipurato de sódio.

Trypticase	10,0 g
Extrato levedura	3,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Hipurato de sódio	10,0 g

Acertar o pH a 5,0, distribuir e esterilizar rotineiramente.

n) Produção de gás e verificação do pH final

Estas provas foram efetuadas no meio para fermentação da glicose, sendo o pH medido em potenciômetro Methrom.

o) Meio para o teste colorimétrico de Snyder

Tryptona	20,0 g
Glicose	20,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Verde de bromocresol	0,02 g
Ágar-ágar	20,0 g

Acertar o pH para 4,8, esterilizar a 121°C. durante 15 minutos.

p) Meio para verificar a formação de polissacarídeo intracelular.

Trypticase Soy ágar	1.000,0 ml
Glicose	3,0 g
Extrato de levedura	2,0 g

Acertar o pH final a 7,2,distribuir e esterilizar

q)Meio para a verificação da formação de polissacarídeo extracelular.

Trypticase	20,0 g
Cloreto de sódio	2,0 g
K_2HPO_4	4,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
Sacarose	10,0 g

O pH final deve ser 7,2 e a esterilização se faz a 121° C, por 15 minutos.

r)Meio para a formação de placa "in vitro"

Tryptose	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
K_2HPO_4	5,0 g
Sacarose	50,0 g

Acertar o pH a 7,2,distribuir em tubos em cujo interior se colocam capilares tendo uma das extremidades curvadas em gancho;esterilizar de modo rotineiro.

s)Solução reveladora de iodo.

Iodo metálico	0,2 g
Solução de iodeto de potássio a 2%	100,0 ml

3.6. Caracterização das amostras isoladas e discriminação das demais provas

Para todos os germes isolados fazíamos, inicialmente, a identificação morfológica, através da coloração pelo Gram de modo a se constatar a pureza da cultura. A seguir transferiam-se alçadas para os meios de reações bioquímicas caracterizadoras. Estabelecemos o seguinte roteiro para identificar as espécies obtidas.

A) Identificação de estreptococos

Formação de colônias mucóides em ágar hipersacarosado: para a realização desta prova, as colônias crescidas em ágar "mitis-salivarius", eram tocadas com alça de platina, que erguida, trazia consigo parte da colônia sob a forma de fio.

Catalase: cobrindo-se o crescimento bacteriano com água oxigenada o despreendimento de pequenas bolhas (aspecto de efervescência) indicava reação positiva.

Viscosidade em meio com sacarose: depois de uma semana de incubação fazia-se a leitura agitando o tubo e comparando sua consistência com outro contendo meio estéril; às vezes a geleificação era tão intensa, que o caldo perdia sua mobilidade.

Precipitação com etanol: Em tubos contendo caldo hipersacarosado e o crescimento do germe, colocavam-se quantidades de etanol nas proporções de 1:1 ou 3:1 a seguir, agitados convenientemente eram os mesmos deixados em repouso; algum tempo depois observava-se a precipitação flocular havida.

Crescimento em meios hipercloreitados: Os germes eram soneados em caldo contendo 4% ou 6,5% de clorato de sódio; após 4 dias o crescimento era anotado.

Crescimento em leite com azul de metileno: os germes crescidos em leite com azul de metileno a 0,01% deveriam ser pesquisados no seu crescimento em leite com 0,1 % do mesmo indicador

Hidrólise do amido: Placas com meio de cultura básico, contendo amido, eram cobertas com solução de iodo, após o crescimento bacteriano. As zonas de hidrólise surgiam como aureólas incolores ao redor das colônias, contrastando com o resto da superfície do ágar que se mostrava violeta.

B) Identificação das leveduras

Morfologia das colônias: estas foram estudadas no seu crescimento em ágar-Sabouraud.

Produção de esporos: parte do crescimento era removido com alça de platina, emulsionado com uma gota de água sobre lâmina e coberto com laminula; a observação ao microscópio se fez com objetiva de 45 aumentos.

Zimograma: os tubos de fermentação eram observados diariamente; a mudança do indicador e presença de ar no tubo de Durham indicavam formação de ácido e gás.

Auxanógramas de fontes de nitrogênio e carboidratos: na superfície do meio básico, semeado com suspensão de leveduras, distribuíam-se pequenas quantidades de fontes de nitrogênio (nitrato de potássio, sulfato de amônio, asparagina, peptona e uréia) ou de carboidratos (glicose, sacarose, lactose, maltose e galactose). O crescimento ao redor de uma das fontes indicava utilização da mesma.

C) Identificação de Lactobacilos

Crescimento no meio seletivo de Rogosa: todas as colônias foram examinadas, tomando-se pequena parcela das mesmas, emulsionando-as em lâmina e corando-as ao Gram. Consideramos como

lactobacilos os bastonetes Gram positivos. O restante da colônia foi repicado após purificação no mesmo meio, para caldo tioglicolato com carbonato de cálcio.

Morfologia das colônias: foi estudada em ágar suco-de-tomate, onde os lactobacilos apresentam colônias características.

Provas de fermentação: consideramos como reação positiva na prova de fermentação, a viragem do indicador e a presença de gás, no tubo de Durham como indicativas da formação de ácido e gás.

Hidrólise do hipurato de sódio: após incubação a 37°C por 2 semanas, adicionava-se ácido sulfúrico a 50%, anotando-se a ocorrência de cristais de ácido benzóico como teste positivo.

Ação da temperatura: a verificação do crescimento, sob diferentes temperaturas, foi realizada no próprio meio para fermentação, incubando-se os tubos a 10°C em geladeira e em estufa a 45°C. O crescimento foi avaliado pela turvação do meio.

Determinação do pH final: a verificação do pH final foi feita no mesmo meio usado para fermentação, através de potenciômetro Metrhon, após 15 dias de incubação.

D) Inoculação e leitura do teste de Snyder

Quantidades de 0,2 ml da diluição inicial do material procedente das várias regiões da boca, eram inoculadas no meio de Snyder previamente fundido e resfriado a 50°C. A leitura dos tubos semeados e incubados foi feita após 24, 48 e 72 horas comparando-se o tubo teste com escala colorimétrica de referência, anteriormente estabelecida, cujas variações de pH foram medidas com potenciômetro. As modificações da coloração do indicador (verde de bromocresol), em função dos diferentes pH foram conferidas com as seguintes indicações:

pH 5,0 - verde azulado (0)

pH 4,6-4,4 verde (+)

pH 4,3-4,2 - ligeir. amarelo (++)

pH 4,1-4,0 - acent. amarelo (+++)

pH 3,9-3,8 - intensa amarelo (++++)

E) Formação de Polissacarídeo Intracelular

Os microrganismos isolados nos meios seletivos foram posteriormente semeados no meio específico para esta prova. Na superfície da placa de Petri depositavam-se algumas gotas da solução reveladora de iodo. As colônias que apresentaram coloração foram assim interpretadas: cor marrom a escura, fortemente positiva; marrom apenas, fracamente positiva e amarelo-claro, negativa.

F) Formação de Polissacarídeo Extracelular

Após o crescimento bacteriano ter-se completado, os microrganismos eram removidos por centrifugação; o sobrenadante era misturado com 3 volumes de etanol e colocado em geladeira por 24 horas; após nova centrifugação por 15 minutos, o sedimento foi dissolvido em água destilada (1/5 do volume original), novamente precipitado com 3 volumes de etanol; essa operação era repetida por 3 a 4 vezes consecutivas, e após centrifugação final o líquido era despresado e o carboidrato dessecado sob a ação de pentóxido de fósforo.

G) Obtenção da placa "in vitro"

Seguimos a técnica de CAMARGO & colab. (1.968). Usamos tubo capilar como superfície para deposição do material mucilaginoso. As culturas produtoras de polissacarídeos (culturas viscosas), foram semeadas em tubos contendo caldo hipersacarosado e o tubo capilar. A incubação se fez a 37° C. em atmosfera de CO₂. De cada 48 horas, os capilares eram transferidos para novo caldo, passadas antes em salina estéril para remover o crescimento não aderente ao capilar.

4. Resultados

Os dados expressos nas tabelas de I a VI referem-se ao número de microrganismos crescidos em meios seletivos semeados com material proveniente de saliva, sulco gengival, placa dental e dorso da língua. Os meios usados foram os de Sabouraud glicosado, Rogosa e "mitis-salivarius" ágar, para o isolamento de leveduras, lactobacilos e estreptococos, respectivamente.

Das 10 crianças examinadas, metade com número acentuado de cárie (crianças de nºs 1 a 5) e a outra metade sem atividade cariiosa (crianças de nºs 6 a 10), isolamos número elevado de colônias dos três germes pesquisados, das quais apenas aquelas que diferiam nas suas características morfológicas e ao Gram é que foram estudadas bioquimicamente para identificação das espécies.

4.1. Identificação e Incidência dos Microrganismos

A) Lactobacilos

Após o isolamento dos lactobacilos no meio seletivo de Rogosa (ROGOSA & colab. 1.951), as colônias diferindo no seu aspecto foram distribuídas na superfície de ágar suco-de-tomate colocado em placa de Petri. Neste meio, algumas das características morfológicas nos permitiram uma identificação sumária dos tipos de lactobacilos completada pelas demais provas. Estes germes apresentaram duas variações na morfologia colonial ao exame com microscópio estereoscópico (XB) e luz incidente sobre as colônias. Estas duas variações e as demais provas bioquímicas permitiram reconhecer nos lactobacilos isolados, aqueles das espécies casei e acidophilus. (Quadro I)

Lactobacillus casei : ficaram enquadrados neste gênero o espécie aquelas culturas que nos deram os seguintes resultados: colônias lisas, convexas, opacas e circulares, com crescimento

à temperatura de 10°C, hidrolisando o hipurato de sódio, não fermenta a arabinose e a xilose, sem produção de gás nas provas de fermentação, mas produzindo queda de pH entre 3,6 e 3,8.

Lactobacillus acidophilus: apresenta colônias rugosas, espraiadas de bordos irregulares; cresce a 45°C, não produz gás, não hidrolisa o hipurato de sódio, ^{não} fermenta a arabinose, xilose, manitol e sorbitol.

TABELA I - Ocorrência de lactobacilos nos diversos nichos da cavidade oral.

Paciente	Placa	Sulco	Saliva	Língua
	Nºx10 ⁴	Nºx10 ⁴	Nºx10 ⁵	Nºx10 ²
1	2	0	0	121
2	0	0	11	279
3	3	0	2	65
4	0	0	7	138
5	0	1	14	235
6	0	0	0	210
7	0	0	2	45
8	0	0	0	119
9	0	0	7	240
10	0	0	0	115

Em 46 sementeiras de material da boca de dez crianças, os lactobacilos ocorreram em 6 amostras de saliva, 1 de sulco, 2 de placa e 10 de material de língua. O número de lactobacilos por ml de saliva variou entre 0 e 14×10^{-3} ; na placa essa variação foi de 0 a 3×10^{-4} ; no sulco de 0 a 1×10^{-4} e na língua, de 45 a 279×10^{-2} . Da análise dos resultados verificamos que a contagem dos lactobacilos nas crianças com e sem atividade de cárie atingiu cifras baixas na placa e sulco, com incidência maior na saliva e acentuada em material de língua.

B) Leveduras

Dentre as leveduras isoladas, nenhuma mostrou a formação de ascósporos, por isso, foram enquadradas no grupo das anascosporógenas. Identificamos duas espécies de leveduras: Candida albicans, na proporção de 93% e Candida guilliermondii, num total de 7%.

Candida albicans: caracteriza-se por apresentar colônias lisas ligeiramente convexas, de coloração creme; algumas amostras produziram clamidósporos; nas provas de fermentação produziram ácido e gás em glicose e maltose, gás em galactose com ácido, porém, tardiamente; só ácido em sacarose; ausência de fermentação da lactose. Auxanograma de hidratos de carbono: aproveitamento da glicose, galactose, sacarose e maltose; negativo para lactose. Com relação às fontes nitrogenadas, somente o nitrato de potássio não foi assimilado.

Candida guilliermondii: colônias de coloração amarelada, cremosas, em geral lisas, por vezes ligeiramente rugosas, planas e brilhantes. Produz ácido e gás em glicose, galactose e sacarose; gás e pouco ácido em maltose; negativo para lactose. Auxanograma de carboidratos e fontes nitrogenadas: aproveitamento da glicose, galactose, sacarose e maltose; negativo para lactose. Não assimila nitrato de potássio. Não forma clamidósporos.

TABELA II - Ocorrência de leveduras nos diversos nichos da cavidade oral.

Paciente	Placa	Sulco	Saliva	Língua
	$N2 \times 10^4$	$N2 \times 10^4$	$N2 \times 10^5$	$N2 \times 10^2$
1	0	0	56	32
2	0	10	10	0
3	2	0	35	12
4	0	0	203	21
5	1	2	0	0
6	0	1	21	2
7	5	8	523	60
8	2	0	1	2
9	0	0	11	8
10	1	2	54	0

As leveduras foram isoladas das 40 amostras de material, num total de 915 colônias, sendo 384 amostras nos pacientes cárie ativos e 531 nos sem cáries. O seu número ocorreu em maioria na saliva dos dois grupos de crianças estudados, com variação entre os limites de 0 a 523×10^{-5} ; na placa, sulco e língua essas variações foram de 0 a 5×10^{-4} , de 0 a 10×10^{-4} e de 0 a 90×10^{-2} , respectivamente.

C) Streptococos

A identificação dos estreptococos exigiu maiores cuidados pelo fato de ser um grupo bastante heterogêneo e apresentar viabilidade frágil. Como utilizamos o meio de "mitis-salivarius" ágar, a identificação inicial se fez nesse mesmo meio através da morfologia das colônias. As prova bioquímicas empregadas posteriormente permitiram agrupar os estreptococos isolados nos diferentes grupos de CARLSSON (1.937 a). Sobre estes microrganismos excelente trabalho de sistemática e ocorrência em placa dental foi realizado por BIRAL (1.968), pesquisa que apresentou como tese de doutoramento. As características morfológicas apresentadas em "mitis-salivarius" ágar, são:

GRUPO I - suas colônias se desenvolvem aderentes ao meio sólido deformando-o, com aspecto liso ou rugoso, de 0,5 a 1,5 mm. de diâmetro e formando polissacarídeo extracelular em grande quantidade. Em caldo contendo 5% de sacarose apresentam crescimento homogêneo, com viscosidade, modificando a consistência do meio líquido; a adição de uma parte de etanol determina a formação de um precipitado sob a forma de flocos. Os estreptococos deste grupo são catalase negativos, não crescem em leite com azul de metileno, apresentam variações na hidrólise da arginina, bem como na fermentação da inulina, rafinose, manitol e sacarose; determina a hidrólise do amido. (Str. sanguis)

GRUPO II - colônias de diâmetro semelhante às anteriores, com aspecto moriforme, rugoso, de bordas irregulares; apresentam acentuada convexidade e por vezes, gota de polissacarídeo no topo da colônia. A viscosidade que apresenta é menos intensa que a dos germes do grupo anterior, havendo precipitação com adição de 1 e 3 partes de etanol; prova da catalase negativa, fermentação da inulina, rafinose, manitol e sorbitol; os demais testes foram negativos (Str. mutans)

GRUPO III - colônias acentuadamente convexas, grandes, lisas e brilhantes inicialmente, tornando-se depois de alguns dias, rugosas. Adicionando-se 3 partes de etanol ao caldo com sacarose há formação de precipitado. Como a morfologia destes germes é inconfundível no meio de isolamento, não fizemos as demais provas de identificação. (Str. salivarius)

GRUPO IV - Colônias de diâmetro variando entre 1 a 3 mm. de cor escura, convexas, bordos inteiros ou ondulados e cremosas. Não floculam em caldo hipersacarosado e nem apresentam viscosidade. Não precipita com adição de etanol. As demais provas não foram realizadas para este grupo. (Str. sp)

GRUPO V - as colônias deste grupo se caracterizam por apresentarem coloração azul escuro. Não formam precipitados nem viscosidade no caldo sacarosado. As outras provas não foram realizadas por serem variáveis.

A incidência dos estreptococos nas diversas regiões da cavidade oral das 10 crianças estudadas, se encontram distribuídas nas Tabelas de números III a VI. Como é possível observar, os estreptococos isolados em grande número, sofrem variações conforme a região da boca de que provém. O seu número na saliva apresentou um total de 527×10^{-7} , para os vários grupos. na língua esse número atingiu proporções maiores igualando-se a 304×10^{-7} , no sulco 625×10^{-7} e na placa 828×10^{-7} .

TABELA III - Ocorrência dos diversos grupos de estreptococos
de CARLSSON, em placa dental
(número de colônias $\times 10^7$)

Paciente	Gr. I	Gr. II	Gr. III	Gr. IV	Gr. V
1	4	42	0	32	14
2	3	23	5	14	9
3	5	32	3	15	17
4	12	51	0	49	16
5	53	15	10	23	42
6	8	18	2	31	8
7	3	9	0	17	30
8	6	15	6	25	31
9	15	6	3	31	17
10	7	23	8	7	13

TABELA IV - Ocorrência dos diversos grupos de estreptococos
de CARLSSON, em sulco gengival.
(Número de colônias $\times 10^7$)

Paciente	Gr. I	Gr. II	Gr. III	Gr. IV	Gr. V
1	1	4	18	18	23
2	0	7	6	3	21
3	2	2	21	5	19
4	4	5	13	31	23
5	3	1	25	1	31
6	12	2	25	12	32
7	4	4	12	7	42
8	8	1	32	3	28
9	1	7	36	8	18
10	3	3	19	15	4

TABELA V - Ocorrência dos diversos grupos de estreptococos
de CARLSSON, na saliva.

(Número de colônias x 10^7)

Paciente	Gr. I	Gr. II	Gr. III	Gr. IV	Gr. V
1	1	2	19	14	10
2	3	1	32	21	15
3	2	5	19	17	5
4	5	7	15	5	4
5	3	4	24	16	7
6	0	1	18	5	11
7	0	0	23	25	25
8	1	4	8	12	4
9	2	0	25	29	7
10	1	3	32	23	12

TABELA VI - Ocorrência dos diversos grupos de estreptococos
de CARLSSON, na língua.

(Número de colônias $\times 10^7$)

Paciente	Gr. I	Gr. II	Gr. III	Gr. IV	Gr. V
1	3	1	41	32	6
2	7	0	37	14	30
3	2	0	35	22	11
4	5	3	40	19	24
5	1	2	52	23	16
6	4	6	48	31	11
7	2	4	32	9	19
8	7	2	29	20	0
9	8	10	47	6	2
10	9	5	39	18	8

4.2. Resultados obtidos com a semeadura de material dos nichos microbianos no meio de Snyder.

O meio de Snyder, semeado com as 40 amostras diferentes de material obtido nas diversas áreas da cavidade oral das 10 crianças examinadas, forneceu os resultados expressos no Gráfico I e Tabela VII.

GRÁFICO I

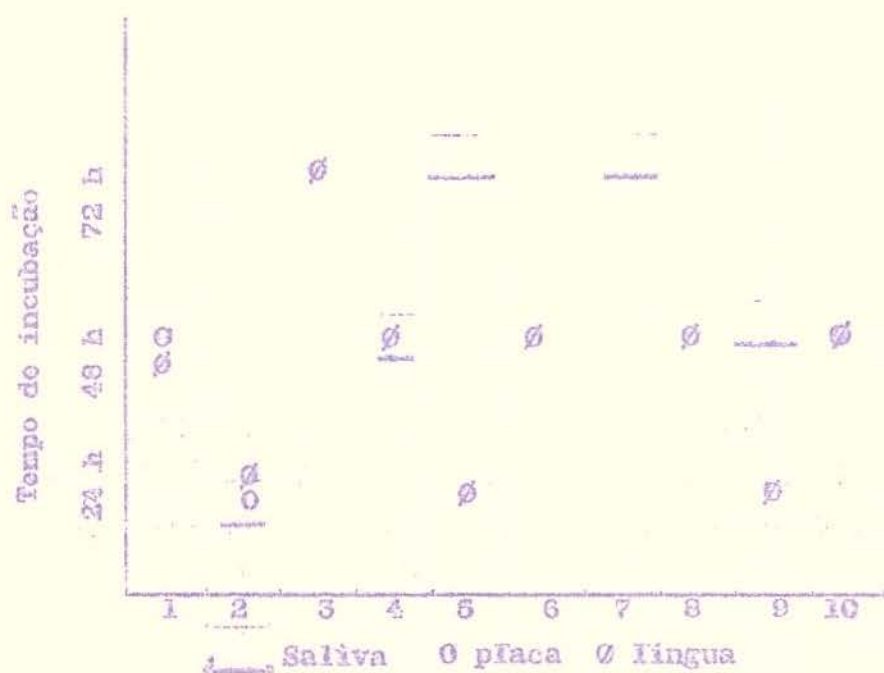


TABELA VII - Medida da atividade cariogênica da microbiota presente na saliva, placa e língua da boca das 10 crianças estudadas.

Paciente	P l a c a			S a l i v a			L í n g u a		
	T e m p o d e I n c u b a ç ã o								
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	+	++	+++				-	++	++
2	++	+++	+++	++	++++	++++	++	+++	+++
3							-	-	++
4				-	++	++	-	++	++
5				-	+	++	++	+++	+++
6							+	++	+++
7				-	+	++	-	-	-
8							-	++	++
9				-	++	++	++	++	+++
10							-	++	++

- negativo + predominância do verde(negativo); ++ verde não é mais a cor predominante(positivo); +++ alteração incompleta para o amarelo(positivo); ++++ alteração completa para o amarelo(positivo)

4.3 - Formação de polissacarídeo intracelular

Com amostras isoladas, num total de 44 para estreptococos dos diversos grupos de CARLSSON, 29 de lactobacilos e 38 de leveduras, fizemos o teste para evidenciar a formação de polissacarídeo intracelular por parte dessas colônias. As amostras crescidas em Trypticase Soy ágar foram cobertas com lugol. As que assumiram coloração marron escura foram consideradas como fortemente iodofílicas e as de côr marron simplesmente, moderadamente iodofílicas. O comportamento das amostras testadas está exposto na tabela VIII.

TABELA VIII

Germes isolados	Nº am.	FI.	MI.	N
<u>C. albicans</u>	35	32	3	0
<u>C. guilliermondii</u>	3	1	2	0
<u>L. casei</u>	26	25	1	0
<u>L. acidophilus</u>	3	3	0	0
<u>Str. sanguis</u>	12	9	3	0
<u>Str. mutans</u>	12	8	4	0
<u>Str. salivarius</u>	8	8	0	0
<u>Str. mitis</u>	12	5	3	4
	111	91	16	4

legenda. Nº am. = número de amostras
 FI. = fortemente iodofílica
 MI. = moderadamente iodofílica
 N. = ausência de reação

4.4. Formação de polissacarídeo extracelular.

De 21 microrganismos de cada gênero submetidos ao teste de formação de polissacarídeo extracelular, pudemos constatar a presença de carboidratos (dextrana) nas culturas dos seguintes germes: Str. sanguis, 5; Str. mutans, 9; Str. salivarius, 3 e Str. mitis, 3.

O polissacarídeo foi precipitado com adição de etanol segundo a indicação da técnica. Após centrifugação, foi o mesmo dessecado e acondicionado em pequenos tubos, para investigações sorológicas posteriores.

4.5. Formação de placa "in vitro".

Os mesmos 21 microrganismos acima empregados, positivos na prova de formação de polissacarídeo extracelular, foram semeados no meio indicado para formação de placa "in vitro"; esse meio foi distribuído em tubos, contendo no seu interior capilares com a extremidade em gancho para favorecer a sua remoção para outros tubos contendo o mesmo meio de cultura. Conseguimos a formação de placa aderente aos capilares, com as seguintes amostras: Str. sanguis, 4; Str. mutans, 6; Str. mitis, 1.

5 - DISCUSSÃO

A cárie dental como lesão de origem bacteriana, não encontrou ainda uma confirmação definitiva quanto ao agente ou agentes responsáveis pelo seu aparecimento. Da soma considerável de trabalhos realizados, três gêneros de microrganismos foram considerados capazes de produzirem a descalcificação das estruturas dos dentes - os lactobacilos, leveduras e estreptococos. Todos eles foram investigados isoladamente, porém, algumas observações tentaram relacionar entre si a incidência dos mesmos, na placa dental e na saliva. Trabalho semelhante tivemos oportunidade de realizar, com pacientes (crianças de 8 a 13 anos de idade), situadas em região diferente do globo, portanto sob condições geográficas diversas e integrantes de camada social com poucos recursos, usando alimentação diferente, mas constante de elevado teor de açúcar. Os resultados que encontramos estão distribuídos nas diversas tabelas e gráfico. O trabalho realizado teve alguns objetivos, dos quais o primeiro foi verificar a incidência de germes acidogênicos nos diferentes nichos da cavidade oral. A análise dos dados obtidos permite afirmar que os lactobacilos foram encontrados poucas vezes no sulco gengival e na placa dental mesmo das crianças com atividade de cárie, nas diluições de 10^{-4} . Alguns resultados com contagens maiores sugerem a contaminação dos raspados de placa dental com material de cárie, onde estes microrganismos são encontrados sempre em grande quantidade; esta explicação é plausível, pois nos casos citados, a contagem de lactobacilos atingiu incidência superior àquela alcançada na saliva e língua. Aliás, nestas duas regiões as contagens de lactobacilos apresentaram sempre índices mais elevados do que as contagens de outras áreas. Em virtude da constância da presença de lactobacilos na língua, pode-se deduzir que o local

de fixação desse gênero de microrganismos é o dorso da língua, considere-se ainda, que para a coleta de material dessa região, com "swabb" estéril, os pacientes haviam realizado bochechos prévios com a finalidade de evitar contaminação da língua pela saliva. Os resultados que obtivemos coincidem com os de BARBOSA & ARAUJO(1.938), contrariamente ao que havia sido observado por GORDON & GIBBONS(1.936); estes pesquisadores, investigando a composição da flora do sulco e da língua não conseguiram isolar lactobacilos. A incidência que encontramos desse tipo de organismos, variando de 0 a 111×10^{-3} na saliva, é menor que aquela encontrada por KRASSE(1.954), pois o referido autor assinalou os limites encontrados na contagem de lactobacilos entre 0 e 800×10^{-3} por ml de saliva. Re refere ainda que as pessoas cárie ativas possuem mais lactobacilos por ml de saliva, do que as inativas. Neste particular obtivemos evidências que nos permitem concordar com o autor, pois embora encontrássemos contagens elevadas em algumas crianças sem cárie elas foram sempre inferiores àsquelas com lesões cariosas. Embora tivéssemos encontrado maior incidência de lactobacilos nos cárie ativos, o que nos permitiria responsabilizá-los pela cárie, discordamos do autor, pois encontramos número bem menor dos mesmos em placa dental. Os nossos achados conferem com as conclusões de BARBOSA & ARAUJO(1.938), que pesquisando a ocorrência de lactobacilos nos nichos microbianos da boca, referem não ter encontrado esses germes em placa e sulco na diluição de 10^{-4} . Sugere o mesmo que na quase totalidade dos casos os nichos não ofereciam condições para implantação de lactobacilos ou não ofereciam condições que permitissem sua proliferação.

A identificação dos lactobacilos isolados revelou pertencerem na sua maioria à espécie casei e os restantes, acido-

philus. Estes resultados concordam parcialmente com as conclusões a que chegaram TILDEN & SVEC(1.952), em trabalho realizado com um grupo de crianças. Encontraram eles na saliva de 53 pacientes flora constituída de 75% de L. casei, microrganismo fortemente acidogênico, que determina abaixamento do pH até 3,6 a 3,8. Em 45 crianças assinalaram o número de 40% de L. fermenti, germe produtor de gases(heterofermentativo); estes, apesar de incidirem em porcentagem acentuada após o L. casei, na saliva, não foi identificado nas amostras que isolamos. A ocorrência das leveduras nos nichos mostrou-se irregular, com predominância por m, na saliva. Os resultados que obtivemos no líquido bucal foram bem maiores que os resultados assinalados por KRASSE(1.954). Segundo o autor, as leveduras atingiram o total de 0 a 76×10^{-3} por ml de saliva, inferior, portanto ao nosso número. Nas contagens de leveduras de placa o autor conseguiu número de colônias que variou de 0 a 6.000, enquanto que nós obtivemos 0 a 5×10^{-4} , notando-se maior número de amostras isoladas de placa de crianças cárie inativas. Estes dados são inversos aos de KRASSE(1.954), segundo o qual os pacientes com elevado número de cárie possuem maior número de leveduras por ml de saliva que os sem atividade cáriesa. GLASS & colab.(1.951), encontrou correlação entre o número de leveduras e atividade de cárie, mas esta dependência não era tão pronunciada como aquela encontrada entre o número de lactobacilos e cárie. O pesquisador mencionado não observou relação entre um alto número de Candida e alto número de lactobacilos; esta observação está em desacôrdo com o que encontramos, pois, na maioria dos pacientes, ao lado de grande incidência de lactobacilos na saliva e língua, obtivemos número elevado de leveduras na saliva; é de se supôr, que para aí sejam carregados através dos alimentos.

Os estreptococos estão presentes em grandes quantidades em toda a cavidade oral. Foram isolados na diluição de 10^{-7} em proporções significativas, nas crianças com atividade cariosa acentuada, o que justifica o esforço dos pesquisadores atuais no sentido de imprimir dedicação especial ao estudo pormenorizado de todas as suas peculiaridades (KRASSE, 1.953; FITZGERALD & KEYES, 1.960; GIBBONS & colab. 1.966).

KRASSE (1.954), encontrou diferença estatisticamente significativa entre o número de estreptococos do material de placa de pacientes cárie ativos e inativos. Não observou, contudo, diferença entre a incidência dos diferentes grupos de estreptococos, sobretudo Str. salivarius, que o autor encontrou em pequena proporção na flora da placa. Como os trabalhos de CARLSSON (1.967 b), DE STOPPELLAR & colab. (1.967) e BIRAL (1.968), mostrassem o papel importante de alguns estreptococos, (Str. sanguis e mutans), na etiologia da cárie dental, ao estudá-los, procuramos verificar a incidência dos mesmos nas regiões das quais coletamos material. Os resultados que obtivemos são altamente significativos, pois eles indicam que essas duas espécies de microrganismos têm uma prevalência acentuada na placa de boca onde a cárie incide de maneira relevante. Os números obtidos para Str. sanguis e Str. mutans em material de placa, dizem muito bem da necessidade desses estreptococos serem pesquisados intensamente no sentido de que se lhes desvendem as relações com o estabelecimento do processo carioso. DE STOPPELLAR & colab. (1.967), isolaram de 24 placas dentais humanas, germes que descreveram como semelhantes ao Str. bovis e Str. sanguis. Os autores referem que as amostras de estreptococos HS-1, que são cariogênicas para o "hamster" (FITZGERALD & KEYES, 1.960) e a amostra de estreptococo GS-5, cariogênica para ratos gnotobiotos, são semelhantes ao Str. bovis; ainda mais, os estreptococos "indutores de cárie"

descritos por KRASSE, em 1.966, bem como os estreptococos dos Grupos I e II de CARLSSON(1.967), este correspondente ao Str mutans(CLARKE, 1.924), possuem características comuns com o Str.bovis. Os estreptococos dos grupos I e II, apresentaram grande variação na sua incidência em material de várias regiões da boca; no entanto, a semeadura de homogeneizado de placa nos permitiu obter crescimento de grande número de colônias, sobretudo aqueles provenientes de crianças com cáries. Neste caso, Str.sanguis e mutans atingiram valores totais de 77 e 163 $\times 10^{-7}$, respectivamente, bem mais elevados que os das crianças sem cárie, representados pelas quantidades de 39 e 71 $\times 10^{-7}$, respectivamente. Conclui-se que a incidência elevada desses tipos de microrganismos nas placas de dentes de crianças com cáries numerosas parecem falar a favor da sua participação na origem desse processo. CARLSSON(1.967), observou que nas placas dentais, dentre os estreptococos produtores de dextrana, o Str.sanguis era dominante com pequena incidência nas outras regiões da boca. Estudando estreptococos de placas dentais humanas e seu significado em relação à cárie, BIRAL(1.968), isolou 81 amostras de estreptococos, onde Str.sanguis representavam 47% e Str.mutans, 11% do total dos achados. Pelos dados que obteve, refere que este último grupo de microrganismos se apresentou uniforme como agentes etiológicamente relacionados à cárie. Os dados que expressamos na Tabela III, revelam que Str.sanguis e mutans incidiram em contagens maiores nos casos em que havia grande número de superfícies cariadas (crianças de 1 a 5). Nossos resultados diferem em parte dos de BIRAL(1.968), pois que encontramos ocorrência maior de Str.sanguis, em relação ao índice CPO-S, de modo que eles também podem ser responsabilizados como agentes etiológicos da cárie. O autor citado verificou que apesar de Str. mutans aparecer em menor porcentagem eles estavam pro-

sentos nos dentes que se mostraram cariados em exame clínico efetuado 6 meses após a primeira observação clínica. Nós não efetuamos exame posterior a colheita do material, mas os resultados que obtivemos indicaram que nas superfícies cariadas que examinamos, os Str. sanguis foram encontrados em número considerável.

Ação dos microrganismos acidogênicos sobre o meio de Snyder.

A alteração do indicador usado no meio de Snyder é determinada pela metabolização da glicose pelas enzimas bacterianas e consequente abaixamento do pH. Nesta prova, para medir a atividade cariogênica, inocula-se a saliva como fonte de microrganismos acidogênicos. Realmente, sempre se admitiu que os lactobacilos guardavam estreita correlação entre a sua incidência na saliva e o número de cáries. Logicamente, a positividade em 24 e 48 horas do teste de Snyder indicaria atividade de cárie intensa e moderada, respectivamente, o que significa dizer presença de número elevado de lactobacilos. Num trabalho realizado em 1.942, SNYDER & TEACHOUT, estudaram a ação de 30 amostras de lactobacilos sobre o meio, observando que 29 viravam o indicador após 48 horas de incubação. Amostras de estreptococos alfa e não hemolíticos não alteraram o indicador até mesmo após 96 horas de incubação. No entanto, em 1.968, LIMA & colab. mostraram que: a) além de lactobacilos, enterococos e estafilococos, determinam modificações no verde de bromo-cresol, distribuídas nas três gradações de teste positivo de Snyder; b) microrganismos redutores do verde-bromo-cresol na saliva, como enterobacter, não produzem abaixamento do pH, mas determinam acentuado clareamento do meio, induzindo à notação de falso teste positivo. Podemos argumentar, pois, que o teste de Snyder indicaria antes de tudo presença de grande número de lactobacilos. Ora, se estes fossem realmente, os responsáveis

pelo aparecimento da cárie, seu número deveria ser elevado na placa de dentes que viessem a cariar e o meio de Snyder indicaria atividade cariiosa sempre que semeado com material de placa contendo microrganismos acidogênicos. Os resultados conseguidos na semeadura de material de placa no meio de Snyder deveriam coincidir com o número de cáries, isto é, o meio de Snyder deveria apresentar viragem para o amarelo em 24 a 48 horas e as contagens de lactobacilos deveriam ser elevadas nestes casos. O que se observou foi que há de fato uma correspondência entre o número de lactobacilos e a positividade do Snyder, mas geralmente quando semeado com saliva. Esta, parece não possuir flora própria, pois os microrganismos que encerram provêm da língua, placa e sulco gengival. Os nossos resultados indicaram quase sempre, número maior de lactobacilos na língua que na saliva; é-nos lícito supor, que o seu contingente na saliva decorre de contaminação com a flora da língua. Aliás, este fato foi muito bem demonstrado por KRASSE (1.954), usando o Str. salivarius. Um outro fato que anotamos foi a alteração do indicador em alguns casos, relacionada com a presença de leveduras do gênero Candida, quando o meio foi semeado com saliva. Esta indicação e mais a incidência de leveduras nos cultivos de saliva, parecem falar a favor da contaminação desse líquido pelos alimentos.

O número de estreptococos é enorme nas várias regiões da boca representando grande porcentagem da flora da placa dental. São acidogênicos, porém sua suscetibilidade ao pH ácido (LIMA, 1.968), impedem o acúmulo de ácido suficiente para promover a modificação do indicador (SNYDER & TEACHOUT, 1.942; LIMA & colab. 1.968). Se considerarmos as contagens significativas para estreptococos e lactobacilos com o material de língua e saliva, relacionadas ao teste de Snyder positivo, poderemos imputar a estes últimos a modificação do indicador do referido

meio. Porém é sabido que há forte relação entre o aparecimen-
to de cárie e presença de placa dental; esta seria, pois, o fa-
tor primordial da origem daquela lesão. Lógicamente um resul-
tado negativo para o Snyder e ausência de lactobacilos nesse
nicho microbiano conduzem-nos a uma única alternativa - res-
ponsabilizar os estreptococos pelo aparecimento da cárie. É
de se ressaltar que na boca das crianças com elevado número
de cáries houve sempre predominância de estreptococos no ma-
terial de placa. A observação de que nos pacientes onde a in-
cidência de cárie é baixa os estreptococos também se fazem
presentes em grande quantidade, levou-nos a indagar dentre os
estreptococos aqueles que encontrados em número significati-
vo em relação à incidência de cárie apresentassem caracterís-
ticas que os diferenciasssem dos demais. A nossa atenção se
voltou pois, para os estreptococos dos grupos I e II da clas-
sificação de CARLSSON. É possível observarmos na Tabela III, que
esses germes foram isolados em números variáveis de 77×10^{-7} e 163×10^{-7} , para Str. sanguis e mutans, nas crianças cárie ativas e
de 39 e 71×10^{-7} , nas crianças sem cáries. Esses tipos de es-
treptococos foram estudados por KRASSE (1.967) em 4 pacientes
alimentados em dias alternados ora com sacarose, ora com gli-
cose. Verificou o autor que o volume de placa obtido quando
a dieta era suplementada com sacarose era superior ao das pla-
cas isoladas após o uso da glicose. No caso inicial observou
Str. sanguis como bactérias dominantes, capazes de produzir dex-
tranas. Igualmente, verificou que a placa dental se mostrou o
mais favorável "habitat" para o Str. mutans, que segundo os
experimentos de KRASSE (1.968), seriam "indutores de cárie".
Investigando a presença de bactérias formadoras de dextrana
em meio hipersacarosado, DE STOPPELLAR & colab. (1.967), isola-
ram germes que descreveram como semelhantes a Str. sanguis e
Str. bovis; este último possui características comuns com o Str.

mutans de CLARKE(1.924)

A característica dos estreptococos assinalados, de produzirem polissacarídeo extracelular foi por nós comprovada nas nossas observações. Semeando 21 amostras de cada gênero dos germes isolados, em meio hipersacarosado, conseguimos abundante formação de polissacarídeo extracelular com as culturas de Str.sanguis(5), Str.mutans(9), Str.salivarius(3) e Str.mitis(3). A presença do polissacarídeo confere ao meio intensa geleificação; com adição do etanol obtém-se a precipitação do carboidrato. A síntese de polissacarídeo extracelular por parte de estreptococos cariogênicos formadores de placa a partir da sacarose, foi estudada por alguns autores(WWOD & CRITCHLEY,1.966; GIBBONS & BANGHART,1.966, FITZGERALD & JORDAN,1.968). Ainda GIBBONS & colab.(1.966) emitiram o conceito de que a formação de dextrana extracelular a partir da sacarose, em particular, por bactérias cariogênicas parece torná-las capazes de formar placas que são necessárias para a produção de cáries. Em contraste, as bactérias não cariogênicas são incapazes de sintetizar quantidades significantes de dextrana e portanto, não formam placas. Assim, a síntese de polissacarídeo extracelular parece ser uma das várias características necessárias para que uma bactéria seja cariogênica, embora MANLY(1.961) tenha afirmado que essas substâncias funcionariam como carboidratos de reserva. Nós conseguimos, porém, utilizando algumas amostras formadoras do referido carboidrato, reproduzir a formação de placa "in vitro", seguindo a técnica de SAMPAIO(1.968).

Depois de 2 a 4 transferências dos capilares para novos tubos de cultura pudemos constatar o aparecimento daquela formação aderente ao capilar. Conseguimos resultados positivos apenas com as amostras de estreptococos. Ainda não menos significativos foram os resultados da nossa experimentação

que nos permitiram verificar uma outra característica dos microrganismos acidogênicos isolados dos diferentes nichos microbianos da boca de várias crianças. A propriedade de produzir polissacarídeo intracelular foi estudada, semeando-se as amostras de leveduras, lactobacilos e estreptococos em meio básico com glicose e cobrindo as culturas, após crescimento, com solução reveladora de iodo. As colônias de germes produtores de polissacarídeo intracelular apresentaram-se de cor garron escura, designadas, pois, de colônias fortemente iodofílicas. Esse carboidrato pode aumentar a duração da produção de ácido, quando a fonte exógena de carboidratos foi consumida. Trabalhos neste sentido foram realizados pelos autores BERMAN & GIBBONS (1.965) e FITZGERALD & JORDAN (1.968). Os resultados que obtivemos confirmam alguns dos conseguidos por GIBBONS (1.962); o autor semeou germes diversos em meio básico suplementado com glicose, maltose, sacarose e glicogênio a 2%. Verificou como capazes de produzirem o referido carboidrato, os seguintes organismos Str. mitis, Str. salivarius, difteróides facultativos e anaeróbios, lactobacillus, fungobacterium e bacteroides spp. A habilidade da flora oral humana de formar polissacarídeo intracelular parece variar com a atividade de cárie e dieta rica em carboidratos. GIBBONS & SOCRANSKY (1.962), demonstraram uma correlação significativa entre a atividade de cárie e a porcentagem de bactérias de placa capazes de sintetizarem o referido carboidrato. Estabelecendo um paralelo entre as colônias formadoras de polissacarídeo intracelular e o número de cárie de 72 crianças, LOESCH & colab. (1.967), verificaram que havia uma estreita relação entre ambos. Das crianças com maior número de lesões cariosas foi possível obter maior número de colônias formadoras do referido polissacáride. Nas bocas sem cáries (10 crianças), as colônias deste tipo perfaziam 3,1% e nas bocas com

com número igual ou superior a 5 cáries, a porcentagem se elevou para 5,2% . Nós não fizemos estudo comparativo entre a incidência de cáries e colônias formadoras de polisacarídeo intracelular, mas, verificamos que leveduras, lactobacilos e estreptococos produzem o mencionado açúcar; a maioria das colônias se mostrou fortemente iodofílicas.

Concluimos, pois, que esta é uma característica comum a uma série de germes, mesmo aqueles que não guardam relação entre a sua incidência e o número de cáries; a participação pois, dessa propriedade na etiologia da cárie depende tanto de uma série de fatores, inclusive da presença de elevado número de germes iodofílicos cariogênicos na placa dental. Observações futuras devem ser feitas no sentido de se determinar o tempo de metabolização do carboidrato intracelular por parte dos germes que o elaboram, bem como a velocidade da formação de ácidos e demais circunstâncias que intervêm na etiologia da cárie dental.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados que a nossa pesquisa nos proporcionou podemos concluir que:

1. Microrganismos do gênero Lactobacillus ocorrem em número elevado na língua; este deve ser, portanto, o seu local de fixação. A ocorrência menor destes germes na saliva indica contaminação da mesma com material de língua.
2. A incidência dos lactobacilos em placa dental é pequena e como existe estreita relação entre esta formação e cárie dental, aqueles germes devem ser excluídos como agentes etiológicos da cárie.
3. As leveduras ocorrem preferencialmente na saliva de crianças com e sem cáries. Seu número em placa dental é pequeno. Pode-se admitir que sejam carregadas para a saliva através dos alimentos.
4. Os estreptococos estão presentes em grande número nos diversos nichos da cavidade oral, sobretudo nas placas dentais. Str. sanguis e Str. mutans guardam uma relação significativa entre sua incidência e o índice de cáries.
5. Parece haver uma relação entre a incidência de lactobacilos e leveduras; a um número maior dos primeiros corresponde quase sempre aumento do número de leveduras.
6. Os lactobacilos promovem a viragem do indicador do meio de Snyder em 24 ou 48 horas proporcionalmente à sua incidência. As leveduras fazem-no também, após 48 horas com intensidade correspondente a um teste de atividade cariosa moderada. Os estreptococos não determinam variações do meio de Snyder.
7. Os gêneros de microrganismos estudados produzem polissacarídeo intracelular que dão reação variável com o lugol.

8. Apenas Str.sanguis, mutans , salivarius e mitis determinaram formação de polissacarídeo extracelular.
9. Nas provas de formação de placa "in vitro", obtivemos resultados positivos com algumas culturas de Str.mutans , Str.sanguis e Str. mitis

- BAIRD-PARKER, A.C., BISSET, K.A., & PIKE, B.B. -1.958- The distribution of Lactobacillus species in northern and Southern Italian communities. Brit.dent.J. 103:137
- BARBOSA, M.T. & ARAUJO, W.C. -1.968 -Ocorrência de Lactobacillus nos nichos microbianos da cavidade da boca, Arg. Cent.Est.Fac.Odont. 5(1):115-122.
- BARTELS H.A. & BUCHBINDER, M. -Yeastlike microorganisms isolated from root canals. Oral Surg.Oral Med.and Oral Path. 7: 98-102, 1.954.
- BLACK, G.V. -1.898-Dr.Black's conclusions reviewed again. Dent. Cosmos, 40:440-451. In Viegas, A.R., 1.961
- BERMAN, K.S. & GIBBONS, R.S. -1.966-Iodophilic polysaccharide synthesis by human and rodent oral bacteria. Archs.oral Biol. 11:533-542
- BIBBY, B.G. & VAN KESTEREN, M. -1.939- Acid productions by oral streptococci and lactobacilli. J.dent.Res., 18:266
- BIBBY, B.G., VOLKER, J.F. & VAN KESTEREN, M. -1.942-Acid production and tooth decalcification by oral bacteria. J. dent. Res., 21:61-72
- BIBBY, B.G. -1.956-Bacteriology of dental caries. Norske Tannlaegeforen.Tid., 66:179-187.
- BIRAL, R.R. -1.968-Estreptococos de placas dentais humanas e seu significado em relação à cárie. Tese. Piracicaba. S.P.
- BLAYNEY, J.R., KESEL, R.G. & WACH, E.C. -1.936-Dental Caries. I. New method of studying Bacterial plaque. J.dent.Res. 15: 326-327.
- BOY, J.D., CHEYNE, V.D. & WESSELS, K.E. -1.948-Correlation of Lactobacillus counts with caries extent in an institutionalized population. J.dent.Res. 27:736-737

- BOYD, J.D. & WESSELS, K.E. - 1.951 - Epidemiologic studies in dental caries. III - The interpretation of clinical data relating to caries advance. Am. J. Publ. Health 41:976-985
- BUNTIG, R.W., NICKERSON, G. & HARD, D. & CROWLEY, M. - 1.928 - Further studies of the relationship of Bacillus acidophilus to dental caries. Dent. Cosmos, 70:1-8
- CAMARGO, P.S., ARAUJO, W.C., JURGENSEN, C.A. & OLIVEIRA, C.M. - 1.968 - Formação de placa dental "in vitro" com estreptococos isolados de placa dental humana. Ciência e Cultura, 20:444.
- CARLSSON, J. & EGELBERG, J. - 1965 - Effect of diet on early plaque formation in man. Odont. Revy, 16:112-125
- CARLSSON, J. - 1.967 a - Presence of various types of non-haemolytic streptococci in dental plaque and in other sites of the oral cavity in man. Odont. Revy, 18:55-74
- CARLSSON, J. - 1.967 b - A medium for isolation of Streptococcus mutans. Archs. oral Biol., 12:1.657-1.658
- CLARKE, J.K. - 1.924 - On the bacterial factor in the etiology of dental caries. Brit. J. Exptl. Path., 5:141
- DE STOPPELLAR, J.D., Van HOUTE, J. & MOOR, C.E. - 1.967 - The presence of dextran-forming bacteria, resembling Streptococcus bovis and Streptococcus sanguis, in human dental plaque. Archs. oral Biol., 12:1.199-1.201
- DOETSCH, R.N., HOWARD, B.H., MANN, S.O. & OXFORD, A.E. - 1.957 - Physiological factors in the production of an iodophilic polysaccharide from pentose by a sheep rumen bacterium. J. Gen. Microbiol. 16, 156-158
- EULER, H. - 1.943 - Tratado de Odontologia. Trad. Espanhola. Barcelona. Editorial Labor B.S.A.
- FITZGERALD, R.J. & KEYES, P.H. - 1.960 - Demonstration of the etiological role of streptococci in experimental caries in the hamster. J. Am. dent. Ass., 61:9-19

- FITZGERALD, R.J. & JORDAN, H.V. -1. 968- Polysaccharide producing bacteria and caries. Apud GIBBONS, R.J. & BANGHART, S. 1. 968
- FOSDICK, L.S., HANSEN, H.L. & EPPLE, C. -1. 937- Enamel decalcification by mouth organisms and dental caries: a suggested test for caries susceptibility. J. Amer. dent. Ass. 24:1. 275-80.
- GALE, J.A. -1. 951- A controlled experiment on pre-school children with an ammoniated dentifrice. Dent. Record 71: 15-16
- GIBBONS, R.J. & BANGHART, J. 967 -Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. Archs. oral Biol., 12:11-24.
- GIBBONS, R.J. & BANGHART, S. -1. 968- Induction of dental caries in gnotobiotic rats with a levan-forming streptococcus and a streptococcus isolated from sub-acute bacterial endocarditis. Archs. oral Biol., 13:297-306
- GIBBONS, R.J., BERMAN, K.S., KNOETTNER, P. & KAPSIMALIS, B. -1. 966 Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin. Archs. oral Biol., 11:549-560
- GIBBONS, R.J., DOETSCH, R.N. and SHAW, J.C. -1. 955- Further studies on polysaccharide production by bovine rumen bacteria. J. Dairy Sci. 38, 1. 147-1. 154
- GIBBONS, R.J. & McDonald, J.B. -1. 962- Studies on the synthesis of intracellular polysaccharide by a strain of S. mitis. Abstracts of the 40th. General Meeting of the International Association for dental research.
- GIBBONS, R.J. & SOCRANSKY, S.S. -1. 962- Intracellular polysaccharide storage organisms in dental plaques. Its relation

- to dental caries and microbial ecology of the oral cavity. Arch. oral Biol. 7:73-80
- GIBBONS, R. J., SOCRANSKY, S. S., ANVESEN, S., KAPSIMALIS, B. & MacDONALD - 1.963 - The microbiota of the Man. II-The predominant cultivable organisms. Arch. oral Biol. 8:281-89.
- GLASS, R. L.: The occurrence of yeasts in the saliva of children. J. dent. Res. 30:468, 1.951
- GORDON Jr., D. F. & GIBBONS, R. J. -1.966- Studies of the predominant cultivable microorganisms from the human tongue Arch. oral Biol. 11:327-32
- GOADBY, K. W. -1.910 -The buccal secretions and dental caries. Brit. Med. J. 2:769-774.
- GREEN, G. E & DODD, M. C. -1.956- Study of the bacterial flora of caries-susceptible and caries-immune saliva. J. dent. Res. 35:572-585
- HADLEY, F. P. -1.933- A quantitative method for estimating Bacillus acidophilus in saliva. J. dent. Res. 13:415-428
- HAMMOND, C. -1.939- Artificial caries produced by Streptococcus viridans. J. dent. Res. 19:1-10
- HARTZELL, T. B. and HENRICI, A. T. -1.917- Pathogenicity of mouth streptococci and their role in the etiologic dental disease. J. Nat. dent. Ass. 4:477-498
- HATTON, E. H. -1.937- The test for susceptibility to dental caries. North-Western Univ. Bull. School. 37:13-16.
- HEMMENS, E. S., BLAYNEY, J. R., BRADEL, S. F. and HARRISON, R. W. -1.946 The microbic flora of the dental plaque in relation to the beginning of caries. J. dent. Res. 25:195-205
- IYER, V. S. -1.952- A clinical and statistical analysis of the relationship of salivary Lactobacillus and yeast counts

- and dental caries. J. All India Dent. Assoc. 24:4-12
- KRASSE, B. -1.954 - The relationship between Lactobacilli, Candida, and streptococci and dental caries. Examination of saliva and plaque material collected on the same occasion. Odont. Revy. 5:241-261
- KRASSE, B. -1.954 -The proportional distribution of Streptococcus salivarius and other streptococci in various parts of the mouth. Odnt. Revy. 5:203-211
- KRASSE, B. -1.966 -Human streptococci and experimental caries in hamsters. Arch. oral Biol. 11:429-436
- KRASSE, B., EDWARDSON, G., SVENSSON, I. & TRELL, L. -1.967- Implantation of caries-inducing streptococci in the human oral cavity. Archs oral Biol. 12:231-236
- KRASSE, B. & ODEEN, H. - 1.955- Comparison of various caries activity tests. Odont. Revy 6:213-221.
- LILIENTHAL, B. -1.951-Yeast-like organisms in the mouth. D. J. Austr. 23:205-207
- LIMA, M. G., ARAÚJO, W. C. & LIMA, J. -1.968- Estudo sobre o teste colorimétrico de Snyder. Arq. Cent. Est. Fac. Odont. 5:115-122, Belo Horizonte.
- LITTLETON, N. W., MCCABE, R. M., & CARTER, C. H., -1.967-Studies of oral health in persons nourished by stomach tube II -Acidogenic properties and selected bacterial components of plaque material. Archs oral Biol. 12:601-609
- LOESCHE, W. J. & HENRY, C. A. -1.967 - Intracellular microbial polysaccharide production and dental caries in a Guatemalan Indian Village. Archs oral Biol. 12:189-194
- MACLEAN, J. W. - 1.927 -Bacteriology of dental caries. Brit. Dent. Jour. 48:579.

- MANLY, R.S. - 1.961 - Retention of carbohydrate from sugar solutions by salivary sediment. J. dent. Res. 40:379
- MILLER, W.D. - 1.890 - The microorganisms of human mouth. Philadelphia, SS, White Dental Mfg. Co. In VIEGAS, A.R. 1961
- MORRIS, E.O. - 1.954 - The bacteriology of the oral cavity. III - Streptococcus. Brit. dent. J., 96: 95-106
- RODRIGUES, F.E. - 1.922 - Studies in the specific bacteriology of dental caries. Milit. dent. J. 5:199-208
- SCHULERUD, A. - 1.950 - Dental caries and nutrition during war time in norway. In BRISLIN, J.F. & COX, G.T. - 1.964 - Survey of the literature of dental caries (1.948-1.960) University of Pittsburgh Press.
- SHIERE, F.R., GEORGI, C.E. & IRELAND, R.L. - 1.951 - A study of Streptococcus salivarius and its relationship to dental caries process. J. dent. Res., 30:116-125
- SIMS, W. - 1.965 - Measurement of the rates of acid production of surface aggregates of Lactobacilli, Streptococci and some other oral micro-organisms. Brit. dent. J., 119:22-26
- SNYDER, M.L. - 1.940 - A sample colorimetric method for the estimation of relative numbers of lactobacilli in the saliva. J. dent. Res. 19:349-355
- SNYDER, M.L. & TEACHOUT, J.J. - 1.942 - Acid production of oral bacteria associated with dental caries. J. den. Res. 21 : 461 - 486
- STEPHAN, R.M. - 1.944 - Intra-oral hydrogen-ion concentrations associated with dental caries activity. J. dent. Res., 23:257-266
- STRALFORS, A - 1.950 - Investigation into the bacterial chemistry of dental plaques. Odont. Tidnkr. 58:155-341.

- TILDEN, E.B. & SVEC, M. -1.952- Further studies of a differential culture technique for estimation of aciduric bacteria in saliva. II -Species of lactobacilli isolated from saliva and their distribution in a group of children. J.dent.Res. 31:831-832
- VAN REENENN, J.F. & VAN der WALT, J.P. -1.955 - A note on the yeast incidence in carious teeth of Urban Europeans and Bantu in South Africa, J.dent. Ass. South Africa , 10:341-344.
- VIEGAS, A.R. -1.961 - Odontologia Sanitária. Aspectos preventivos da cárie dentária. 1a ed. São Paulo, s.c.p., pgs.8 ; 92-96; 104-114
- WILLIAMS, J.L. -1.897 - A contribution to study of pathology of enamel. Dent. Cosmos, 39:169-269
- WILLIAMS, N.D., FORBES, M.A., BLAU, E. & EICKENBERG, C.F. -1.950 - A study of simultaneous occurrence of enterococci, lactobacilli, and yeasts in saliva from human beings., J.dent.Res., 29:563-570.
- WILSON, T.E., GOAZ, P.W. & RAMSEY, H.H. -1.959 - The oral yeast-lactobacillus relationship. I -Non utilization of hexosephosphates by an oral lactobacillus. J.Amer. dent. Ass. 58:64-69
- WOOD, J.M. & CRITCHUEY, P. -1.966 -The extracellular polysaccharide produced from sucrose by a cariogenic streptococcus. Archs oral Biol., 11:1.039-1.042
- YARDENI, J., SULITZEANU, D. & CITRI, N. -1.959 - Streptococci in dental caries. J.dent.Res., 38:164-171
- YOUNG, G., KRASNER, R.I. & YODLOFSKY, P.L. -1.956 -Interactions of oral strains of Candida albicans and lactobacilli. J. Bact. 75, 525
- ZINNER, D.D., ARAN, A.P., JABLON, J.M. & SASLOW, H.S. -1.965 - Experimental caries induced in animals by streptococci of human origin. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 118:766-770



1. Dentes dentat



2. Colônias patocáricas



3. Polissacarídeo in-
tracelular



4. Polissacarídeo in-
tracelular



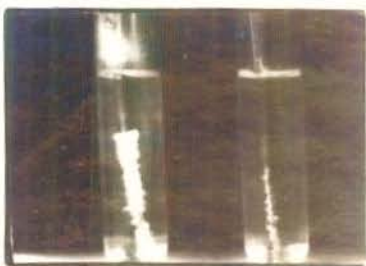
5. Polissacarídeo ex-
tracelular



6. Colônias de
Str. mutans



7. Str. mutans



8. Teste "in vitro"