



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): **CAROLINA STEINER OLIVEIRA**



Ano de Conclusão do Curso: 2003

TCC 031

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

**Potencial cariogênico de *Streptococcus mutans* e
Streptococcus sobrinus. Análise de microdureza do
esmalte dental submetido à cárie artificial**

Orientador: Reginaldo Bruno Gonçalves

Orientado: Carolina Steiner Oliveira

PIRACICABA

2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA

**Agradeço FERNANDO ALVES MACIEL por toda a ajuda e apoio
dispensado em todos os momentos desse trabalho e que comigo
compartilhou todas as dificuldades e virtudes alcançadas.**

SUMÁRIO

Lista de Ilustrações	pág 04
Introdução	pág 05
Desenvolvimento	pág 08
Conclusão	pág 17
Referências bibliográficas	pág 18

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Esquema sobre a confecção dos blocos dentais e seus respectivos meio de cultura pág 09
- Figura 2 – Corpo de prova imerso no meio de cultura BHI sacarose 5% pág 10
- Figura 3 – Aparelho de Microdurômetro..... pág 11
- Figura 4 – Esquema ilustrativo das diferentes localizações das identações a serem realizadas na superfície de esmalte seccionada..... pág 12
- Figura 5 – Recipiente com inóculos bacterianos..... pág 13

INTRODUÇÃO

Os estreptococos do grupo mutans são os principais microrganismos associados à etiologia da cárie dental, sendo seu papel no desenvolvimento dessa, já bem estabelecido (LOESCHE, 1986). Atualmente, o grupo mutans é composto por sete espécies bacterianas diferentes, sendo essas: *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus macacae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus rattus* (WHILEY & BEIGHTON, 1998).

Além de apresentarem grande habilidade adesiva e ácido-secretora (HIROSE *et al.*, 1993), reúnem outros fatores de virulência para o desenvolvimento da cárie dental, como aciduricidade e capacidade de síntese de polissacarídeos intracelulares e extracelulares solúveis e insolúveis (LOESCHE, 1986). Esses polissacarídeos extracelulares formados pelos estreptococos do grupo mutans participam no mecanismo de adesão às superfícies dentais possibilitando a deposição de placa bacteriana.

A acidogenicidade bem como a aciduricidade são características que tornam estes estreptococos, em grande parte, responsáveis por cáries dentais (KAUFMAN *et al.*, 1988), estando essas relacionadas à perda de mineral promovida pelos ácidos produzidos, com conseqüente redução do pH da placa dental a um valor inferior ao pH crítico do esmalte, cerca de 5,5 (LOESCHE, 1986).

Sabe-se que os *S. mutans* e *S. sobrinus* são as espécies mais prevalentes e importantes na patogênese da cárie dental (WHILEY & BEIGHTON, 1998), apresentando um elevado potencial indutor de lesões cariosas (LINDQUIST & EMILSON, 1991; HIROSE *et al.*, 1993), sendo isoladas exclusivamente em humanos. Segundo LINDQUIST & EMILSON (1991), o *S. mutans* é a espécie mais encontrada na cavidade bucal, seguida pelo *S.*

sobrinus. Nesse estudo, os autores chamam a atenção para o grande número de sítios anatômicos da cavidade oral, onde ambas as espécies foram detectadas juntas, indicando, desta forma, uma provável associação entre esses organismos.

DE SOET *et al.* (1991) analisando as diferenças no potencial cariogênico entre *S. mutans* e *S. sobrinus*, verificaram que o número de lesões cariosas 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 esses resultados se devem a diferenças nas propriedades glicolíticas entre as duas espécies.

Vários estudos (CARLSSON, 1968; BEIGHTON *et al.*, 1987; KÖHLER & BJARNASSON, 1987; LINDQUIST & EMILSON, 1991; AHAMADY *et al.*, 1993; HIROSE *et al.*, 1993) demonstraram uma relação positiva entre a presença de uma dessas duas espécies, isoladamente, e a cárie dental. No entanto, quando se apresentam associadas, elevam o índice desse processo infeccioso em seus portadores (LINDQUIST & EMILSON, 1991; AHAMADY *et al.*, 1993).

Avaliando a saliva de escolares, HIROSE *et al.*, 1993 observaram que as crianças que possuíam *S. mutans* e *S. sobrinus* apresentavam índices de cárie mais elevados que aquelas colonizadas apenas por uma das espécies, e que o *S. sobrinus* estava mais associado às lesões de superfície lisa, apontando para uma maior capacidade de adesão desse microrganismo à estrutura dentária.

Em adição, a diversidade dessas espécies bacterianas é evidente, considerando-se as próprias variações fenotípicas observadas através de estudos de sorotipagem, tipagem de bacteriocinas e biotipagem (BOWDEN, 1997). Essa diversidade dos clones bacterianos selecionados pode estar associada com uma maior virulência (MUSSER *et al.*, 1988; MAYER *et al.*,

1999). Entretanto pouca informação existe sobre a diversidade dos *S. mutans* e o seu impacto na transmissão e severidade da cárie dental (BOWDEN, 1997), apesar de grandes variações na cariogenicidade de cepas de *S. mutans* isoladas de humanos terem sido observadas em modelos animais (KÖHLER & KRASSE, 1990; de SOET *et al*, 1991).

O papel individual da bactéria e a fermentação de seus ácidos em cáries são mais facilmente estudados em cultura pura do que no complexo ecossistema da placa dental (GALLAGHER *et al*, 1983), facilitando, desta forma, a obtenção de resultados *in vitro*.

O presente trabalho utiliza a análise de microdureza de fragmentos de esmalte dental submetidos a um processo de formação de cárie artificial, para avaliar o potencial cariogênico *in vitro* dos *S. mutans* e dos *S. sobrinus*, isolados ou em associação e esclarecer se existe diferença entre a capacidade de desmineralização do esmalte dental por *S. mutans* e *S. sobrinus*.

DESENVOLVIMENTO

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo dos Fragmentos de Esmalte

Os fragmentos de esmalte utilizados neste estudo foram obtidos de dentes bovinos hígidos (EDMUNDS *et al.*, 1988). Antecedendo a fragmentação, ocorreu a remoção de debris com o auxílio de curetas periodontais, e os dentes foram polidos com taça de borracha, pedra pomes e água, em baixa rotação. Em seguida, com disco diamantado de dupla face (K G Sorensen Ind e Com LTDA), cada dente é seccionado transversalmente, eliminando-se a porção radicular, e longitudinalmente, separando-o em fragmentos. Assim, foram obtidos 4 fragmentos da face vestibular, de cada dente, selecionados com o auxílio de uma lupa estereoscópica (Meiji EMZ – Meiji Techno CO. Ltda, Japan), tendo como padrão a ausência de defeitos de superfície. Os fragmentos dentais foram desgastados com o auxílio do disco diamantado dupla face até se obter as dimensões em esmalte de 4mm x 4mm (16 mm²), conferidos com paquímetro digital (Starret ME 155mm, Microtec Ind e Com LTDA). Depois desses procedimentos, todos os fragmentos dentais são identificados e armazenados em recipientes com água destilada e deionizada.

As amostras são autoclavadas durante vinte minutos, a uma temperatura de 121°C, com resfriamento úmido. Esse procedimento de esterilização, além de eficaz (PANTERA JR e SCHUSTER, 1990; PARSELL *et al.*, 1988), não altera a dureza do esmalte dental (PARSELL *et al.*, 1988) nem interfere no seu padrão de desmineralização (AMAECHI *et al.*, 1988).

Produção da Lesão

Inicialmente foi realizado um estudo a fim de determinar o tempo ideal para a produção de lesão de cárie dental *in vitro* (estudo piloto). Esse tempo correspondeu à desmineralização do esmalte necessária para a obtenção de uma resistência suficiente à sensibilidade do microdurômetro. Para isso, cada um dos 4 fragmentos dentais foi incubado em meios de cultura inoculados com cepas padrões *S. mutans* (ATCC 25175), *S. sobrinus* (ATCC 27607), *S. mutans* + *S. sobrinus* ou um controle negativo (sem inóculo), por períodos pré-determinados de 7, 14, 21 dias (Figura 1).

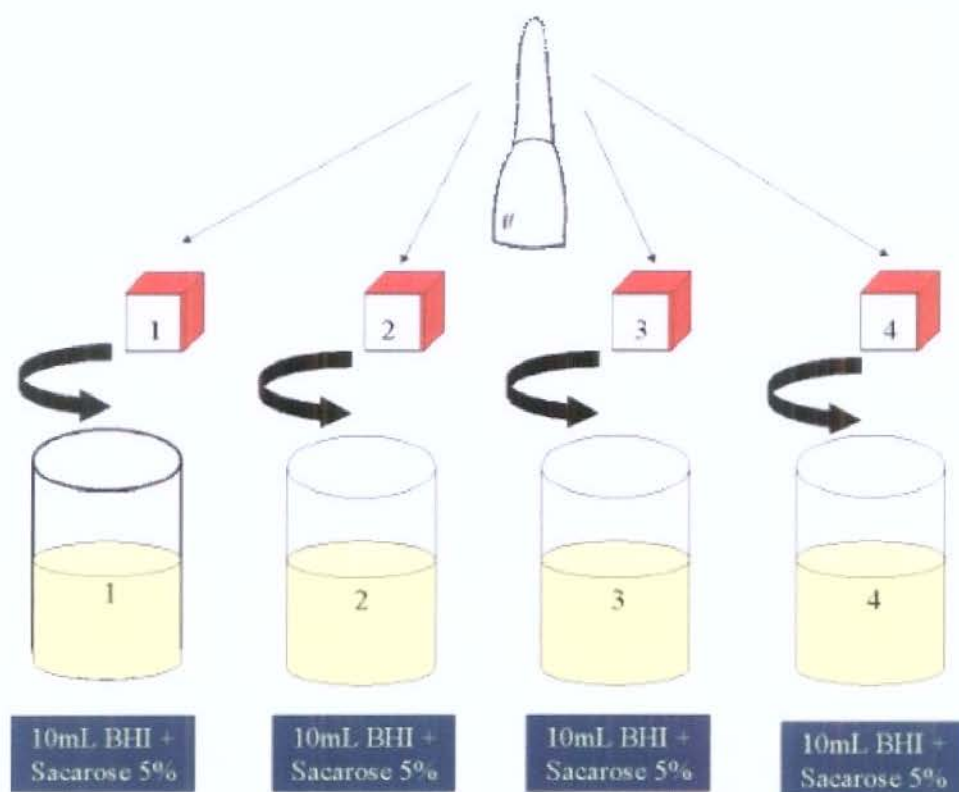


Figura 1

As amostras bacterianas foram previamente inoculadas em meio BHI e incubadas a 37°C por 24 horas a 10% CO₂, para obtenção de culturas puras recentes. A suspensão bacteriana foi ajustada para $1-2 \times 10^8$ UFC/mL. Aliquotas de 100µL de cada amostra foram inoculadas em 10 mL de meio BHI contendo 5% de sacarose. Os fragmentos de dentes esterilizados foram

introduzidos nos tubos teste de maneira a serem totalmente imersos pelo meio de cultura (Figura 2) e incubados por 24h a 37°C a 10% CO₂.



Figura 2

As unidades de dentes foram subseqüentemente transferidas juntamente com 100µL da suspensão bacteriana para um novo tubo com 10 mL de meio BHI (5% de sacarose), e incubadas novamente. Esse processo foi repetido durante os tempos pré-determinados, de modo que ao final do período experimental, os dentes foram submetidos a 7, 14, 21 dias de desafio cariogênico. Após cada período de 24h, os meios de cada tubo foram checados para se controlar a presença de organismos contaminantes.

Obtenção dos corpos de prova

Após cada período experimental, os fragmentos dentais removidos foram seccionados longitudinalmente ao meio, com disco diamantado e embutidos em resina de poliéster. Para acabamento foi utilizada uma politriz elétrica rotativa (Maxgrind - Solotest) com lixas abrasivas de óxido de alumínio de granulações 400, 600 e 1000 refrigeradas com água, a uma velocidade de 300 rpm. O polimento seqüencial foi realizado numa politriz semelhante, com pasta de diamante de 3 e 1 µm em um disco de tecido (Buehler) refrigerado com óleo mineral em velocidade de 300 rpm. Os corpos de prova foram considerados prontos para serem submetidos ao ensaio de microdureza, quando observada, em lupa estereoscópica, a ausência de riscos superficiais deixados pelos abrasivos.

Ensaio de Microdureza

As análises de microdureza foram efetuadas em microdurômetro (Future Tech – FM - 1e, Japan) (Figura 3), com penetrador tipo Knoop e carga estática de 25 gramas aplicadas por 5 segundos.

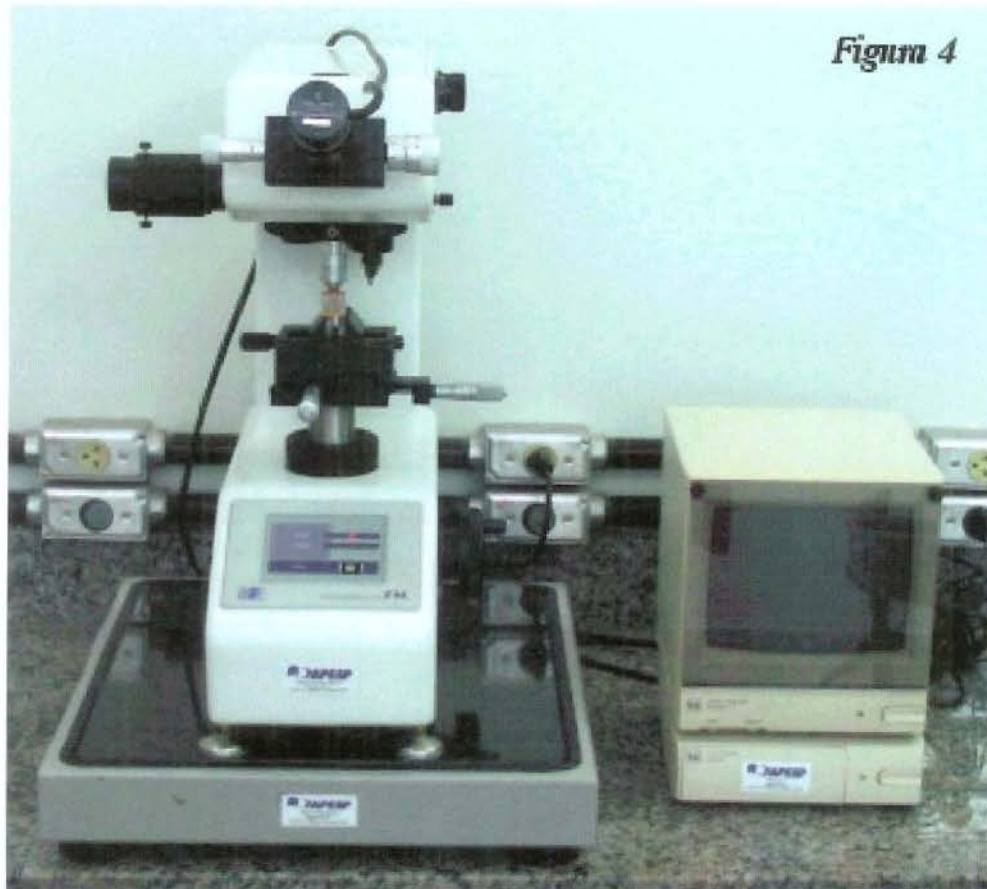


Figura 4

Foram realizadas doze identações em cada fragmento dental: a $30\mu\text{m}$, a $50\mu\text{m}$, $70\mu\text{m}$ e a $100\mu\text{m}$ da superfície, estando o longo eixo do diamante paralelo à superfície do esmalte. A primeira impressão, denominada A_1 , localizar-se-á a $1800\mu\text{m}$ do limite superior do fragmento e a $30\mu\text{m}$ da superfície do esmalte. As impressões B_1 e C_1 se localizarão também a $1800\mu\text{m}$ do limite superior, porém a $50\mu\text{m}$, $70\mu\text{m}$ e $100\mu\text{m}$ da superfície, respectivamente. A partir dessas impressões iniciais serão realizadas outras nove, paralelas às anteriores, que receberão índices 2 ou 3, dependendo da localização a $2000\mu\text{m}$ e $2200\mu\text{m}$ do limite superior do fragmento dental (Figura 4).

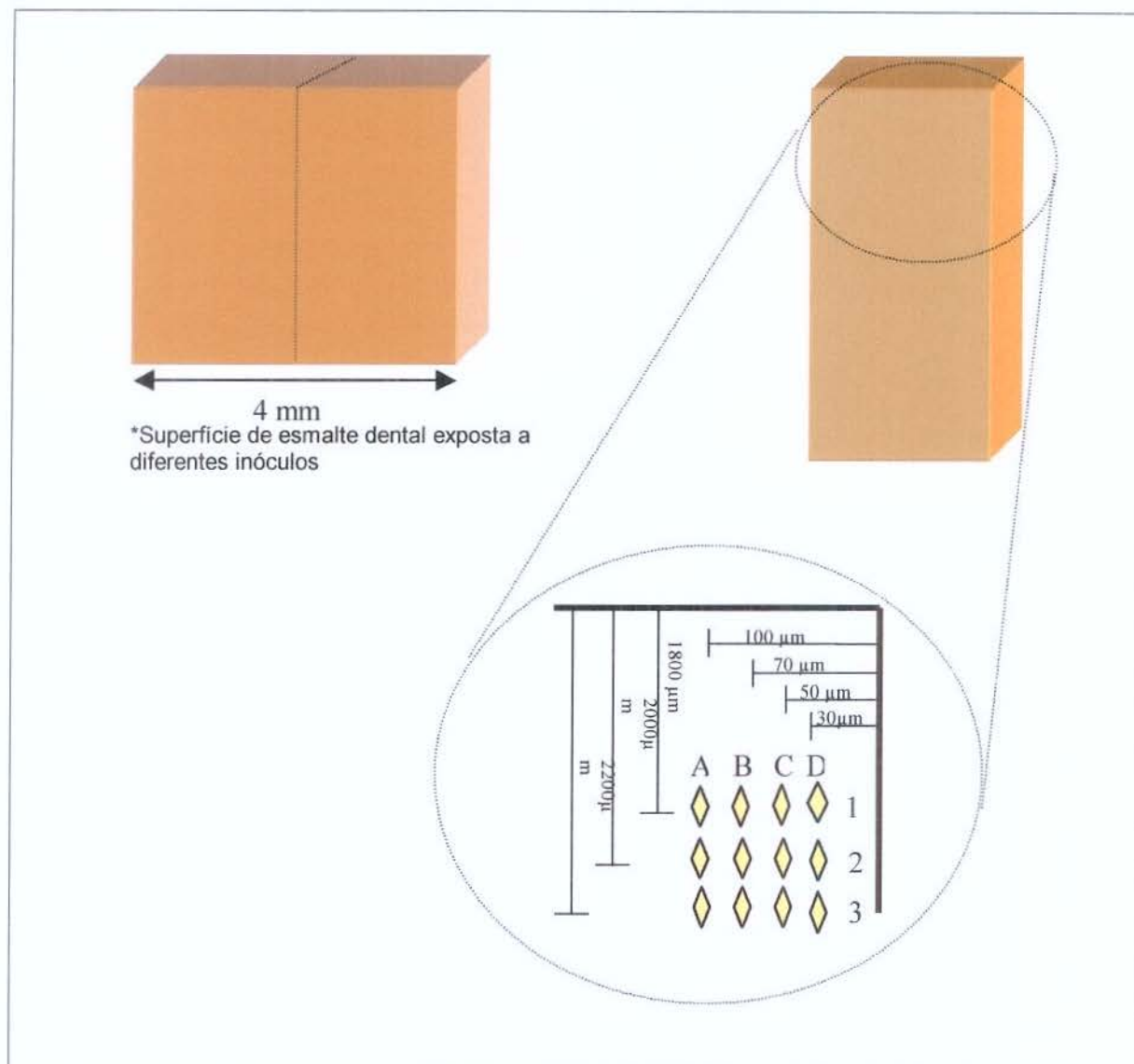


Figura 4 – Esquema ilustrativo das diferentes localizações das identações a serem realizadas na superfície de esmalte seccionada.

Trocas de inóculo a cada 12 horas

Após o estudo piloto, foi utilizada a mesma metodologia descrita anteriormente, variando-se apenas os tempos de troca do meio de cultura BHI sacarose 5% contendo novo inóculo bacteriano e os recipientes usados na incubação (Figura 5). O período de desafio cariogênico utilizado foi de 14 dias, esse determinado, em estudo piloto, como o mais efetivo para produção da lesão e análise de microdureza. Em decorrência da alteração dos recipientes, passou-se a utilizar 1mL de meio de cultura, mantendo-se a mesma proporção do inóculo bacteriano descrita anteriormente, ou seja, 10 μL de cada cepa

bacteriana em 1mL de BHI sacarose 5%. No caso da associação das cepas, utiliza-se 50% de cada uma delas no inóculo bacteriano.

As trocas passaram a ser feitas nos períodos de 12 em 12 horas para tentar detectar possíveis diferenças na velocidade de produção de ácidos pelas espécies utilizadas no experimento.



Figura 5

Trocas de inóculo a cada 6 horas

Utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente, variando-se apenas os tempos de troca do meio de cultura BHI sacarose 5% contendo novo inóculo bacteriano. O período de desafio cariogênico utilizado foi de 14 dias, esse determinado, em estudo piloto, como o mais efetivo para produção da lesão e análise de microdureza. Utilizou-se 1mL de meio de cultura, mantendo-se a mesma proporção do inóculo bacteriano descrita anteriormente, ou seja, 10 μ L de cada cepa bacteriana em 1mL de BHI sacarose 5%. No caso da associação das cepas, utiliza-se 50% de cada uma delas no inóculo bacteriano.

As trocas passaram a ser feitas nos períodos de 6 em 6 horas para tentar detectar possíveis diferenças na velocidade de produção de ácidos pelas espécies utilizadas no experimento.

RESULTADOS

Os valores das identações em micrômetros foram convertidos em valores de dureza Knoop, através do seguinte cálculo:

$$HK = 14.230 \times F / d^2$$

HK – valor de dureza Knoop

F – carga utilizada (25g)

d – comprimento da diagonal maior da indentação

O estudo realizado com trocas de inóculo a cada 24 horas permitiu demonstrar que a eficiência da metodologia utilizada para a produção de cárie *in vitro*. A partir dos resultados obtidos na análise de microdureza do esmalte dental, conclui-se que todos os fragmentos dentais submetidos aos desafios cariogênicos com *S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. mutans* + *S. sobrinus*, desenvolveram lesão de cárie (estatisticamente significante em relação ao controle). Também foi observado que apesar de todos os fragmentos submetidos às cepas bacterianas terem sofrido lesão cariosa, o período de 14 dias foi o mais adequado para a realização do ensaio de microdureza. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre as espécies estudadas quanto à capacidade de desmineralização do bloco de esmalte dental, demonstrado a partir das discrepâncias no tamanho das identações.

Já o estudo realizado com trocas de inóculo feitas a cada 12 horas, O teste Two-way-ANOVA indicou que, para todos os tempos de trocas de inóculo

bacteriano e em todas as profundidades, o grupo controle apresentou o valor mais alto, sendo estatisticamente significativo ($p > 0,05$, Two-way ANOVA test). Esse foi seguido em ordem decrescente pelo grupo dos dentes submetidos aos *S. mutans* e *S. sobrinus*, que não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$, Two-way ANOVA test) e à associação desses microrganismos, em que foi encontrado o menor valor de microdureza. Entretanto, não foram encontradas diferenças estatísticas em nenhuma das profundidades avaliadas ($p > 0,05$, Two-way ANOVA test).

No estudo realizado com trocas de inóculo a cada 06 horas conclui-se que todos os fragmentos dentais submetidos aos desafios cariogênicos com *S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. mutans* + *S. sobrinus*, desenvolveram lesão de cárie. Não houve diferenças estatísticas entre as espécies quanto à capacidade de desmineralização do esmalte dental.

DISCUSSÃO

A doença cárie é caracterizada pela perda de minerais decorrente da produção de ácidos pelos microrganismos que habitam a cavidade oral. Tendo em vista essa desmineralização das estruturas dentais, foi utilizada a análise de microdureza do esmalte dental, que reflete a perda de mineral quantitativamente (FEATHERSTONE *et al*, 1983), provendo uma avaliação muito mais detalhada da desmineralização desse esmalte (FEATHERSTONE *et al*, 1983).

Houve diferença quantitativa dos valores de dureza Knoop entre as espécies avaliadas. Em todos os estudos realizados (6h, 12h e 24h) os fragmentos controle apresentaram os menores valores de dureza, o que significa que foi o que menos desmineralizou.

Sobre todos os resultados obtidos dos estudos foi aplicado o teste estatístico Two-way-ANOVA, que apresentou diferenças estatísticas entre a desmineralização provocada pelas diferentes espécies, sendo que a associação de *S. mutans* e *S. sobrinus* foi a que mais desmineralizou o bloco de esmalte dental, seguido pelo *S. sobrinus* e *S. mutans*. Diferenças estatísticas entre esses microrganismos não foram encontradas nem com 6 ou 24 horas de troca de inóculo. Isto provavelmente porque após 24 horas de cultivo tanto *S. mutans* quanto *S. sobrinus* foram capazes de abaixar o pH do meio de cultura para níveis capazes de desmineralizar o esmalte dental. No estudo com trocas de inóculos a cada 06 horas o cultivo para essas bactérias e sua associação não foi suficiente para produzir ácidos em quantidades a formar lesões de cárie que pudessem ser diferenciadas pela medida de microdureza e então diferenciar o potencial cariogênico entre as espécies estudadas. O tempo de 12 horas foi o melhor e assim foi possível detectar diferenças estatísticas entre a capacidade de desmineralização das espécies, sugerindo que quando em associação esses microrganismos têm um maior potencial cariogênico. Por outro lado alguns autores (EMILSON *et al*, 1987 e de SOET *et al*, 1991) afirmam que o *S. sobrinus* seria mais cariogênico que o *S. mutans*. Utilizando a metodologia e as cepas descritas acima, esse trabalho obteve resultados que discordam desses autores, sugerindo que essas duas espécies possuem o mesmo potencial cariogênico, já que não houve diferença estatística ($p > 0,05$), Two-way ANOVA test) entre os potenciais cariogênicos entre as duas espécies.

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos nesse trabalho, pôde-se concluir que ainda se faz necessários estudos sobre a ação das bactérias *S. mutans*, *S. sobrinus* e sua associação no meio bucal, mas que todas são capazes de provocar desmineralização no esmalte dental em qualquer um dos tempos testados no desafio cariogênico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHAMADY, 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*, v.27, p.135 -139, 1993.
2. BEIGHTON, D.; RIPPON, H.R.; THOMAS, H.E.C. The distribution *S.mutans* serotypes and dental caries in a group of 5 to 8 year old Hampshire schoolchildren. *Br Dent J*, v.162, nº3, p.103 -106, 1987.
3. BOWDEN, G.H. Does assessment of microbiol composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? *Community Dent Oral Epidemiol*, v.25, nº1, p.76 - 81,1997.
4. CARLSSON, J. A numerical taxonomic study of human oral streptococci. *Odont Revy*, v.19, nº2, p.137-160, 1968.
5. CAUFIELD, P.W.; CUTTER, G.R.; DASANAYAKE, A.P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res*, v. 72, nº1, p.37 - 45, 1993.
6. DE SOET, J.J.; VAN LOVERENG, C.; LAMMENS, A.J.; PAVICIC, M.J.A.M.P.; HOMBURG, C.H.E.; TEN CATE, J.M.; DE GRAAFF, J. Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. *Caries Res*, v.25, nº2, p.116 -122, 1991.

7. EDMUNDS, D.H.; WHITTAKER, D.K.; GREEN, R.M. Suitability of human, bovine, equine and ovine tooth enamel for studies of artificial bacterial carious lesions. *Caries Res*, v. 22, p. 327 - 336, 1988.
8. GALLAGHER, I. H. C.; PEARCE, E.I.F.; CUTRESS, T.W. Artificial caries produced by different oral bacterial cultures incubated with bovine dental enamel. *Archs Oral Biol*, v. 28, n° 4, p.317 – 325, 1983.
9. 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*, v.27, p.292 - 297, 1993.
10. KAUFMAN, H.W.; POLLOCK, J.J.; GWINNETT, A.J.. Microbiol caries induction in the roots of human teeth *in vitro*. *Archs Oral Biol*, v.33, n° 7, p.499 - 503, 1988.
11. KÖHLER, B.; KRASSE, B. Human strains of mutans streptococci show different cariogenic potential in the hamster model. *Oral Microbiol Immunol*, v.5, n°4, p.177 - 180,1990.
12. KÖHLER, B.; BJARNASON, S. Mutans streptococci, lactobacilli and caries prevalence in the 11 and 12 years old Iceland children. *Community Dent Oral Epidemiol*, v.15, n°6, p.332 - 335, 1987.
13. LINDQUIST, B.; EMILSON, C.G. Dental location of *S. mutans* and *S. sobrinus* in humans harboring both species. *Caries Res*, v.25, p.146 - 52, 1991.
14. LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*, v.50, p.353 - 80, 1986.
15. MAYER, M.P.A.; BUENO, L.C.; HANSEN, E.J.; DIRIENZO J.M. Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and

- features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. ***Infect Immune***, v.67, n°3, p.1227 - 1237, 1999.
16. **MUSSER, J.M.; KROLL, J.S.; MOXON, E.R.; SELANDER, R.K.** Clonal population structure of encapsulated *Haemophilus Influenza*. ***Infect Immun***, v.56, n°8, p.1837 – 1845, 1988.
17. **PANTERA Jr, E.A.; SCHUSTER, G.S.** Sterilization of extracted human teeth. ***J Dent Educ***, v.54, p.283 – 285, 1990.
18. **PARSELL, D.E.; STEWART, B.M.; BARKER, J.R.; NICK, T.G.; KARNs, L.; JOHNSON, R.B.** The effect of steam sterilization on the physical properties and perceived cutting characteristics of extracted teeth. ***J Dent Educ***, v.62: p.260 - 263, 1988.
- WHILEY, R.A.; BEIGHTON, D.** Current classification of the oral streptococci. ***Oral Microbiol Immunol***, v.13, p.195 - 216, 1998.