

VARIÁVEIS SOCIAIS, SALIVARES E MICROBIANAS ASSOCIADAS ÀS DIFERENÇAS NA EXPERIÊNCIA PREGRESSA DE CÁRIES DENTAIS

Social, salivary and microbiological factors associated to previous experiences of dental caries

Clarice de Fátima Kamaroski¹
Carla Valéria Caramori Barszcz²
Emily Tiemy Ito²
Rosimeire Takaki Rosa²
Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa³

Resumo

Foram avaliadas algumas variáveis sociais e salivares (velocidade de Fluxo Salivar, pH salivar e capacidade tamponante salivar) e a microbiota cariogênica (contagem de estreptococos do grupo mutans, identificação das espécies, genotipagem por RAPD, produção de ácidos fixos e aderência em superfícies de vidro) de indivíduos livres de cáries, de indivíduos sem cáries ativas e de indivíduos com altos índices de cáries ativas. Os resultados obtidos não permitiram inferir acerca da discrepância na experiência de cáries observada nos três grupos, pois eles apresentaram discreta variabilidade para as variáveis estudadas.

Palavras chave: Cárie dentária; Saliva; Streptococcus mutans; Fatores de virulência.

Abstract

In this paper, it was evaluated some social and salivary variables (salivary flux, salivary pH, buffer capacity) and the cariogenic microbiota (mutans streptococci counts, species identification, genotyping by RAPD, acid secretion, and adherence to glass surfaces) from caries-free subjects, inactive-caries subjects, and active-caries subjects. The results did not allow inferring about the discrepancy in the caries experience of the three groups, once they displayed a discrete variability for the studied variables.

Keywords: Dental caries; Saliva; Streptococcus mutans; Virulence factors.

¹ Cirurgiãs-Dentistas. Ex-bolsistas do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica.

² Mestre. Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

³ Mestre e Doutor. Laboratório de Estomatologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Rua Imaculada Conceição, 1155 CEP 80215-901 Curitiba, PR -Email: edvaldo.rosa@pucpr.br
Rev. de Clín. Pesq. Odontol., v.2, n.1, ju./set. 2005

Introdução

Dentre as diferentes patologias que acometem a boca, a cárie dentária é uma das mais relevantes, devido particularmente à sua alta frequência nas diferentes populações (1).

Bactérias acidogênicas tendem a colonizar as superfícies dos dentes pela produção de polissacarídeos extracelulares e, sob condições favoráveis, produzem ácidos que iniciam o processo de desmineralização da parte inorgânica dos dentes pela quebra da homeostase de cálcio e fosfato (2). O *Streptococcus mutans* apresenta grande habilidade adesiva e ácido-secretora (3), sendo o coco Gram-positivo mais rotineiramente isolado da placa dental, das lesões cariosas e da saliva (4).

Foi demonstrada baixa frequência de isolamentos positivos de *S. mutans* e uma baixa porcentagem dessa espécie em relação aos estreptococos totais isolados de placa dental em indivíduos livres de cárie, quando comparados com outro grupo composto por indivíduos cárie-ativos (5). Tal observação reforça a proposição de que esse organismo está diretamente relacionado com o estabelecimento da cárie dental, bem como que a resistência do hospedeiro pode, em parte, ser atribuída à redução do desafio microbiano.

Também foi relatado que em 20% dos indivíduos livres de cárie não foi detectada a presença de *S. mutans*, ao passo que no grupo dos pacientes cárie-ativos foi possível o isolamento dessa bactéria em todos os indivíduos (6). Nos 80% restantes do grupo livre de cárie, o número de sítios onde foi possível o isolamento, e o valor UFC nesses sítios foi relativamente menor que na casuística do grupo dos pacientes cárie-ativos.

Embora a cárie dental tenha sido extensivamente estudada, existem poucos relatos sobre as características salivares e microbiológicas de indivíduos com diferentes graus de estadiamento da patologia. O presente estudo buscou avaliar o impacto de diferentes fatores sobre a atividade de cárie em grupos com diferentes perfis.

Face à carência de dados que expliquem as diferenças existentes na composição e ecologia da microbiota bucal dos indivíduos com diferentes históricos de cáries dentais, o propósito central do projeto que aqui se

apresenta é a geração de dados que possam contribuir no pleno entendimento dessas diferenças.

Casuística e Métodos

Delimitação dos grupos experimentais

Neste estudo, somente foram incluídos no estudo voluntários que concordaram com os requisitos estabelecidos pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Trinta voluntários de ambos os sexos, com idade variando entre 17 e 30 anos e que não estavam fazendo uso de medicação antibiótica ou imunossupressora, foram distribuídos em três grupos, em função de sua experiência progressiva de cárie: a) com índice CPOD = 0 (Grupo I); b) CPOD > 0 sem lesões ativas de cárie (Grupo II) e; c) CPOD > 0 com lesões ativas de cárie (Grupo III).

Exame dos fatores comportamentais

Os voluntários dos diferentes grupos foram classificados quanto à(s) classe(s) social(is) a(s) qual(is) pertencem (A-E), de acordo com critérios da ABA-ABIPEME modificados (7). Um questionário contemplou as informações acerca da frequência do uso de flúor, dos hábitos de higiene e dos hábitos dietéticos dos voluntários.

Velocidade de fluxo salivar (VFS)

A cada voluntário foi fornecido um pedaço de goma de mascar sem edulcorantes. A saliva estimulada inicial foi deglutida e a partir desse momento foi tomado o tempo de 5 minutos, quando então toda a saliva produzida foi colhida em um tubo graduado, com o auxílio de um funil. A saliva produzida nesse intervalo de tempo teve seu volume aferido, cujo valor numérico foi dividido por cinco de forma a se determinar o fluxo salivar expresso em mililitros de saliva/minuto.

pH salivar

O pH fisiológico da saliva foi determinado por potenciometria de pH.

Capacidade tamponante salivar (CTS)

Um mililitro da saliva, cujo pH fisiológico foi recentemente determinado, foi transferido para um tubo ao qual foram adicionados 3mL de HCl 5mM. Esse tubo foi homogeneizado e mantido em repouso. Após dez minutos, o valor de pH foi novamente tomado.

Exame bacteriológico

Uma espátula de madeira esterilizada foi introduzida na boca de cada voluntário, rodada para umidificação de toda superfície e pressionada sobre a superfície dorsal da língua. A seguir, ambos os lados da espátula foram levemente pressionados contra a superfície de placas tipo Rodac contendo Agar Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose (bacitracina 0,2UI/mL e sacarose 15%). As placas foram incubadas em jarras com pCO₂ 10% a 35°C, por 48 horas. A contagem do número médio de colônias crescidas foi feita a partir das duas impressões, tomando-se uma área de 1,5cm² localizada aquém das extremidades das impressões. Das colônias típicas de estreptococos do grupo mutans, foram tomadas quinze colônias para posterior identificação das espécies (8-10).

Determinação dos genótipos de *S. mutans*

Os isolados cujas identificações foram positivas para *S. mutans* foram submetidos à análise discriminatória clonal pela técnica de RAPD. Células bacterianas foram crescidas em BHI e depois centrifugadas e lavadas. Os depósitos celulares foram ressuspensos em tampão TE-SDS 10% e incubados por 30 minutos a 65°C. As suspensões foram centrifugadas e os sobrenadantes foram descartados. As células foram aquecidas em forno de microondas (490 W/2,5min). Os debris celulares foram ressuspensos em tampão TE.

As ampliações foram efetuadas em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) (35 ciclos: 94°C/1 min; 36°C/2 min; 72°C/2 min) usando o primer OPA-05 (5'-AGGGGTCTTG-3') e 1?L das suspensões como template. Os amplicons foram separados por eletroforese em agarose. Os géis foram

corados com brometo de etídio e as imagens foram capturadas numa câmera digital.

As análises dos padrões de bandeamento (fingerprintings) foram feitas pela comparação visual. Fingerprints foram considerados similares quando todas as bandas principais eram idênticas e as bandas secundárias não apresentaram mais que duas diferenças de posicionamento.

Os isolados pertencentes a uma mesma variante genética de *S. mutans* foram agrupados e tratados como sendo a mesma entidade biológica e então foram submetidos às provas que determinaram seus potenciais de virulência cariogênica.

Produção de ácidos fixos

As amostras bacterianas foram crescidas BHI até transmitância de 80% (550 nm). Aliquotas de 100?L foram inoculadas em tubos contendo 5 mL de BHI com sacarose 10% (35°C/pCO₂ 10%). O pH das culturas foi mensurado com 0, 1, 2, 4, 6 e 12 horas após a inoculação em potenciômetro calibrado e dotado de eletrodo de esgotamento.

Também foram conduzidas análises titulométrico-potenciométricas dos meios de cultura nos diferentes intervalos de tempo, empregando-se como agente neutralizador uma solução de NaOH 0,05M recém-preparada. A acidez de cada cultura foi expressa em milimoles de ácido láctico por mililitro de meio de cultura (11). Cada amostra bacteriana foi testada em triplicata.

Aderência em superfícies de vidro

As amostras bacterianas foram crescidas em BHI até transmitância de 80% (550nm). Aliquotas de 100mL foram inoculadas em tubos de vidro 12x75mm contendo 3mL de BHI com sacarose 1%. Os tubos inoculados foram incubados (35°C/pCO₂ 10%/18 horas) em inclinação de trinta graus. Após a incubação, os tubos foram levemente agitados em vórtex por cinco segundos e o caldo contendo células não aderidas foi transferido para um segundo tubo (#2). Então 3mL de tampão fosfato de potássio (0,05M, pH 7,0) foram adicionados aos primeiros tubos que foram novamente agitados levemente por cinco segundos, em vórtex. O tampão contendo

células desprendidas foi transferido para um terceiro tubo (#3). Os tubos #2 e #3 foram centrifugados por cinco minutos a 10000rpm e os sedimentos foram ressuspensos em 3 μ L do mesmo tampão fosfato. No tubo #1, 3 μ L de tampão foram adicionados. Todos os tubos (#1, #2 e #3) foram imersos em banho de ultra-som em potência máxima, com 10 pulsos de um segundo, seguidos de mais vinte segundos de vibração contínua. A densidade óptica das suspensões foi medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550nm. A proporção de células aderidas foi calculada dividindo os valores de absorbância obtidos para os tubos #1 pela soma dos valores de absorbância obtidos para todos os tubos (#1, #2 e #3). Os resultados foram expressos em porcentagem e cada amostra bacteriana foi testada em triplicata (12).

Análise estatística

Com a finalidade de se eliminar a hipótese nula de que as diferenças observadas entre os grupos seriam devidas ao acaso, os resultados foram analisados quanto à sua normalidade de distribuição e empregados o teste analítico de Student (teste t) e o teste não paramétrico de MannWhitney, com nível de significância de 5%.

Resultados

Após a execução das avaliações e ensaios, observou-se que os três grupos eram

compostos por 30% de mulheres e 70% de homens. Os grupos I e II apresentavam dissonâncias (teste t; $p > 0,05$) em relação ao grupo III, quanto ao seu estadiamento nas diferentes classes socioeconômicas. De acordo com os critérios estabelecidos pela tabela da ABA-ABIPEME modificada (7), o enquadramento dos voluntários ficou assim disposto: grupo I (100% classe A), grupo II (80% classe A, 20% classe B), e grupo III (40% classe B, 30% classe C, e 30% classe D).

A totalidade dos voluntários dos grupos I e II relatou pleno acesso ao atendimento odontológico desde a infância, o que ficou evidenciado, ao menos em parte, pela presença de selantes oclusais em 20% e 30% dos voluntários dos grupos I e II, respectivamente. No caso dos voluntários do grupo III, somente aqueles 40% dos voluntários oriundos da classe socioeconômica B relataram acesso ao serviço odontológico desde a infância. A frequência de contatos com o dentista, de acordo com as informações fornecidas pelos voluntários, está apresentada na figura 1, que mostra a disparidade, sobretudo entre os grupos I e III.

Os relatos obtidos juntos aos voluntários mostram não haver diferenças (teste t, $p > 0,05$) entre os diferentes grupos no que tange ao consumo de sacarose ou outros açúcares fermentáveis (em média duas vezes ao dia, nas sobremesas), acesso à água fluoretada, rotina de escovação (média de 3,4 escovações ao dia) e uso de fio dental.

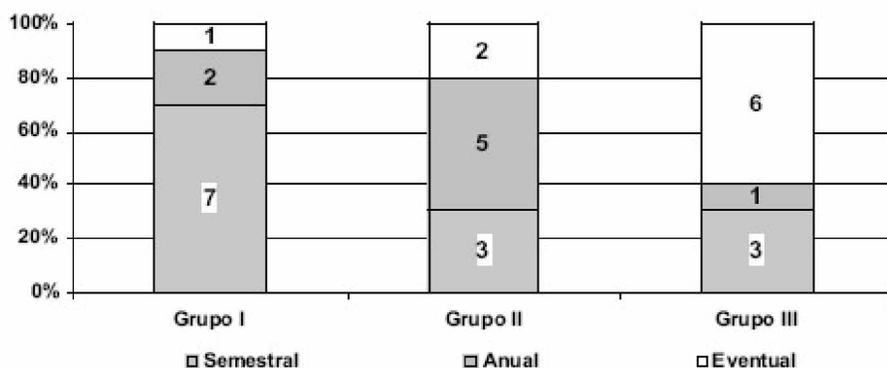


Fig 1. Frequência de visitas ao dentista.

Os voluntários do grupo I divergiram dos voluntários dos outros dois grupos (Mann-Whitney; $p < 0,05$) apresentando uma ligeira redução nas médias dos valores de idade (tabela 01). De forma análoga, os valores para os

índices CPOD divergiram significativamente entre o grupo I e os dois outros. Quanto às variáveis salivares, os três diferentes grupos mostraram não divergirem entre si (tabela 1).

Tabela 1. Valores médios das variáveis salivares dos diferentes grupos.

	Idade (anos)	CPOD	pH salivar	VFS (mL/min)	CTS (pH final)
Grupo I (n = 10)	20,0 ± 1,01 ^a	0,0 ± 0,00 ^a	5,96 ± 0,12 ^a	1,24 ± 0,41 ^a	5,00 ± 0,57
Grupo II (n = 10)	22,6 ± 2,27 ^b	6,7 ± 4,32 ^b	6,00 ± 0,00 ^a	1,84 ± 0,81 ^a	5,25 ± 0,48 ^a
Grupo III (n = 10)	21,9 ± 0,59 ^b	8,9 ± 2,99 ^b	6,00 ± 0,00 ^a	1,58 ± 0,83 ^a	5,15 ± 0,78 ^a

Notas: CPOD dentes caria dos, perdidos e obturados; VFS velocidade de fluxo salivar; CTS capacidade tampão salivar. Diferença estatisticamente significativa determinada para variáveis dos três grupos (Mann-Whitney; $p < 0,05$).

Tabela 2. Valores médios das variáveis microbianas dos diferentes grupos.

	UFC estreptococos grupo mutans	S.mutans	S. sobrinus	S. cricetus
Grupo I (n = 10)	1,48x10 ⁵ ± 1,98x10 ⁵ ^a	66%	29% ^a	5% ^a
Grupo II (n = 10)	1,43x10 ⁵ ± 1,63x10 ⁵ ^a	74% ^a	26% ^a	0% ^a
Grupo III (n = 10)	2,90x10 ⁵ ± 1,61x10 ⁵ ^b	90%	10% ^b	0% ^a

Notas: UFC Unidades Formadoras de Colônias. Diferença estatisticamente significativa determinada para variáveis dos três grupos (Mann-Whitney; $p(0,05)$).

A determinação semiquantitativa de estreptococos do grupo mutans em Agár-Mitis-Salivarius-Bacitracina-Sacarose demonstrou que os elementos dos três grupos achavam-se densamente colonizados no momento das coletas, sem, contudo, serem encontradas variações entre as médias de valores nos grupos I e II. Os componentes do grupo III apresentaram-se, em média, colonizados com o dobro das bactérias cariogênicas dos outros dois grupos, o que incorre em diferenças estatisticamente significativas em relação aos outros grupos. A espécie predominante foi o *Streptococcus mutans*, cuja incidência não

apresentou diferenças significativas nos três grupos. A incidência de *S. sobrinus* foi muito próxima nos grupos I e II, que se apresentaram em maior proporção percentual quando comparados com a taxa de incidência no grupo III. *Streptococcus cricetus* foi detectado somente em quatro voluntários do grupo I.

O RAPD permitiu detectar a presença de variantes clonais de *S. mutans* nos indivíduos com diferentes experiências de cárie, como demonstrado na tabela 3. Nos diferentes grupos analisados foi detectada a ocorrência de 1-4 clones (média 2,66 clones) em voluntários do grupo I, 1-3 clones (média 1,88 clones) em

voluntários do grupo II e 1-5 clones (média 3,00 clones) em voluntários do grupo III.

Tabela 3. Relação de clones de *S. mutans* observados nos diferentes grupos.

Grupo	Voluntário	N.º de amostras	N.º de clones
Grupo I	GA1	2	2 (GA1-a)
	GA2	12	3 (GA2-a, GA2-b, GA2-c)
	GA3	6	3 (GA3-a, GA3-b, GA3-c)
	GA4	9	4 (GA4-a, GA4-b, GA4-c, GA4-d)
	GA5	8	3 (GA5-a, GA5-b, GA5-c)
	GA6	5	3 (GA6-a, GA6-b, GA6-c)
	GA7	11	2 (GA7-a, GA7-b)
	GA8	10	2 (GA8-a, GA8-b)
	GA9	8	2 (GA9-a, GA9-b)
Grupo II	GB1	1	1 (GB2-a)
	GB2	5	2 (GB2-a, GB2-b)
	GB3	3	2 (GB3-a, GB3-b)
	GB4	8	2 (GB4-a, GB4-b)
	GB5	11	3 (GB5-a, GB5-b, GB5-c)
	GB6	6	2 (GB6-a, GB6-b)
	GB7	3	1 (GB7-a)
	GB9	9	3 (GB9-a, GB9-b, GB9-c)
	GB10	7	2 (GB10-a, GB10-b)
	Grupo III	GC1	11
GC2		4	
GC3		7	5 (GC3-a, GC3-b, GC3-c, GC3-d, GC3-e)
GC4		11	4 (GC4-a, GC4-b, GC4-c, GC4-d)
GC5		14	5 (GC5-a, GC5-b, GC5-c, GC5-d, GC5-e)
GC6		9	1 (GC6-a)
GC7		13	2 (GC7-a, GC7-b)

Tabela 4. Valores médios das medidas de virulência dos clones de *S. mutans* dos diferentes grupos.

Grupo	Queda de pH				Produção de ácido mMol/mL ácido láctico				Aderência
	1H	2H	4H	6H	1H	2H	4H	6H	%
I	6.0 ^a	5.5 ^a	5.0 ^a	5.0 ^a	0.08 ^a	1.50 ^a	20.0 ^a	2.40 ^a	25 ^a
II	6.0 ^a	5.5 ^a	5.0 ^a	5.0 ^a	1.00 ^a	1.60 ^a	2.00 ^a	2.50 ^a	28 ^a
III	6.0 ^a	5.0 ^a	5.0 ^a	4.5 ^a	1.10 ^a	1.70 ^a	2.20 ^a	2.70 ^a	34 ^a

^a diferenças não significativas entre as médias dos valores para os diferentes grupos.

Os valores médios das medidas de virulência dos diferentes clones de *S. mutans* obtidos dos voluntários com diferentes experiências de cárie se encontram disponíveis na tabela 4. As médias foram obtidas após os ensaios envolvendo 24 clones de *S. mutans* do grupo I, 17 clones do grupo II e 21 clones do grupo III. O teste t de Student não mostrou significância estatística entre as médias dos valores analisados.

Discussão

Esperava-se, em princípio, a ocorrência de correlação positiva entre a classe socioeconômica onde se encontram locados os voluntários e a atividade de cárie, expressa como diferenças nos índices CPOD, conforme já relatado por outros pesquisadores (13, 14). Contudo, observou-se que o CPOD médio para os voluntários do grupo II (80% classe A, 20% classe B) não apresentou diferenças significativas em relação ao do grupo III, composto exclusivamente por indivíduos cárie-ativos e com maior pluralidade socioeconômica. Tal achado pode decorrer da imprecisão do

índice, que não segrega os casos de lesões ativas dos casos de lesões inativas. Outra possível explicação advém do fato de que os integrantes do grupo I são todos acadêmicos de Odontologia (100%) e filhos de Cirurgiões-Dentistas (80%), ao passo que os componentes dos outros dois grupos são universitários de outros cursos (grupo II) e pacientes da Clínica de Odontologia (grupo III). É de se esperar que os membros do grupo I recebam desde a primeira infância uma maior atenção quanto aos cuidados profiláticos. Embora os integrantes dos outros dois grupos reportem frequência nas escovações dentárias, não se pode assegurar o grau de qualidade de tais procedimentos, posto que a informação foi tomada por questionários.

O acesso ao serviço odontológico regular (semestral ou anual) mostrou-se variável, com perceptível redução na frequência e número de visitas, em função do aumento da diversidade de classes socioeconômicas. Nossos achados estão em concordância com os de outros pesquisadores (15-18), que demonstram a necessidade da intervenção profilática periódica, sobretudo naquelas camadas populacionais mais sujeitas ao risco de cáries.

Embora os voluntários do grupo I fossem relativamente mais jovens que os dos outros dois grupos ($p < 0,05$), as diferenças baseadas na experiência progressa de cáries não podem ser somente atribuídas a tal variável (19). Para esses autores, o acesso ao serviço odontológico permite a preservação dos dentes com a instalação e acompanhamento de estratégias profiláticas a serem conduzidas no domicílio, e devem ser aplicadas em função das necessidades e não da idade dos pacientes.

Os exames das variáveis salivares velocidade de fluxo salivar, pH salivar e capacidade tamponante salivar não mostraram diferenças significativas que suportassem a observação de diferenças na experiência de cáries entre os grupos. Em adultos, grupos com diferentes experiências de cárie, quando comparados, não apresentam diferenças nas medidas de tais variáveis, salvo exceções onde exista comprometimento glandular (20). Esses exames são ferramentas importantes para a determinação do risco de cáries em crianças (21) que tendem a apresentar maiores valores de pH salivar que adultos (22). Nossos resultados corroboram com a premissa de que

variáveis salivares em adultos sadios tendem a apresentar um baixo poder preditivo para risco de cáries.

As contagens totais de estreptococos do grupo mutans foram significativamente maiores no grupo de voluntários com cáries ativas. Tal achado, embora apresente uma correlação positiva com a elevação dos índices CPOD ($r_s = 0,500$; $p > 0,05$), não permite uma sustentação plena da teoria de que indivíduos alocados no grupo III apresentam lesões ativas em decorrência de uma sobrecolonização por bactérias cariogênicas. A colonização só pode ser considerada como crítica quando atinge valores superiores a 5×10^5 UFC/mL (23), e nossos valores foram inferiores a este, mesmo no grupo III. Não obtivemos uma contagem de estreptococos do grupo mutans maior no grupo II que no grupo I, o que já era esperado para grupos de indivíduos com restaurações recentes por cáries (20).

A relativa maior colonização por bactérias cariogênicas nos voluntários do grupo III pode ser devida à presença das cavitações, que fornecem condições ecológicas favoráveis a um incremento numérico nas populações dessas bactérias (24).

Foi demonstrado que para populações de adultos jovens, com idades muito semelhantes às dos nossos voluntários, o risco de desenvolvimento de cáries dentais não pode ser determinado somente com base em contagens de estreptococos do grupo mutans (25). Nesse estudo prévio, assim com em nosso, tanto o grupo com maiores valores CPOD quanto o grupo com valores inferiores se apresentavam colonizados com populações bacterianas inferiores a 106 UFC/mL.

Alguns clones bacterianos podem ser mais virulentos que outros como demonstrado em *Haemophilus influenzae* (26) e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (27). Entretanto, existe pouca informação disponível sobre a relação entre a diversidade clonal e as características de virulência de *S. mutans* assim como seu comportamento quando comparados indivíduos com diferentes experiências de cárie. Estudos têm demonstrado a existência de uma diversidade genética intra-individual de *S. mutans* (28-31). porém, não existe um consenso sobre a relação de atividade de cárie com a diversidade genética de *S. mutans*. Por ribotipagem, foram identificados mais de um

clone de *S. mutans* entre as crianças que apresentavam cárie rampante, enquanto apenas uma criança livre de cárie apresentou mais de um ribotipo, sugerindo que indivíduos com maior atividade de cárie apresentam maior diversidade clonal de *S. mutans* (29). Por outro lado, foi sugerido que clones específicos de *S. mutans* são selecionados em crianças com alta atividade de cárie (32).

Neste estudo não foram detectadas variações significantes nos números de genótipos na saliva de indivíduos com cáries ativas quando comparado aos indivíduos livres de cáries. Tal achado contrapõe resultados publicados anteriormente (29) onde os autores preconizaram que a existência de múltiplos genótipos bacterianos na placa dental pode ser conseqüência de circunstâncias favoráveis à colonização de estreptococos do grupo *mutans*, onde um ambiente mais propício pode suportar o crescimento de múltiplos genótipos mais adaptados ao ambiente cariogênico, muito embora seja possível que a ação simultânea de algumas cepas com potenciais cariogênicos distintos possam elevar o risco à cárie.

O biofilme dental é composto por uma comunidade bacteriana complexa, que alberga diversos microorganismos, inclusive *S. mutans*, e que está exposta às diversas situações de estresse fisiológico, como excesso ou limitação de nutrientes, baixo pH, alta osmolaridade, oxidação e freqüente exposição a antimicrobianos (33). A adaptação a um ambiente altamente competitivo por transformação genética não ocorre freqüentemente, porém, quando esta ocorre, pode ser altamente vantajosa para o microorganismo, podendo este adquirir um gene de resistência a um ou mais antibióticos ou um fator de virulência, promovendo grande vantagem seletiva (34). O efeito do ambiente na diversidade genotípica de *A. naeslundii* e *S. oralis* no biofilme dental proveniente de indivíduos livres de cárie e cárie-ativos foi pesquisado (35) e os autores encontraram um número de genótipos de *A. naeslundii* muito próximo em ambos os grupos; porém, o número de genótipos de *S. oralis* recuperado do biofilme proveniente de indivíduos cárie-ativos mostrou-se superior e estatisticamente significativo, quando comparado com o grupo de indivíduos livres de cárie. Os autores sugerem que devido ao constante estresse

ambiental, como a queda de pH, podem ocorrer alterações ecológicas no biofilme dental para algumas espécies bacterianas. Nossos resultados apontam para a possibilidade de que esses fenômenos possam não ocorrer com o *S. mutans*.

No presente estudo, o pH final das cepas de *S. mutans* provenientes de indivíduos do grupo III apresentaram valores ligeiramente mais baixos que as cepas do grupo de indivíduos livres de cárie, porém, não foi possível estabelecer uma correlação entre os valores de pH final e o índice de cárie dos indivíduos. Em concordância com esses resultados, outros grupos também não demonstraram nenhuma relação entre a acidogenicidade e a atividade de cárie em cepas de *S. mutans* isolados de humanos com altos e baixos índices de cárie (36, 37). Estes resultados demonstram que outros fatores além da produção de ácido são de grande importância no desenvolvimento da cárie, como alterações na microbiota bucal, fatores salivares, exposição ao flúor e a freqüência de ingestão de açúcares fermentáveis (38). As diferenças na experiência de cárie podem ser mais bem explicadas em função de hábitos dietéticos do indivíduo que pela espécie bacteriana envolvida (39). A síntese de glucanos insolúveis a partir de sacarose é um importante fator de virulência de *S. mutans*, permitindo o acúmulo destes microorganismos nas superfícies dos dentes (40). Um estudo que utilizou cepas mutantes deficientes em um, dois ou três genes que codificam as glicosil transferases demonstrou que na ausência de um ou mais genes as cepas são capazes de aderirem menos ao vidro na presença de sacarose quando comparado a uma cepa selvagem (41). Outro estudo realizado em modelo animal com cepas que não expressam a enzima mostrou uma produção significativamente menor no número de lesões de cárie em superfícies dentárias lisas e oclusais em ratos, quando comparada com cepas selvagens (42).

A capacidade de aderência dos *S. mutans* não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados, apesar da média apresentada pelas cepas de *S. mutans* proveniente dos indivíduos do grupo III ter sido ligeiramente superior. Estes dados estão de acordo com outros já publicados (37).

Concluiu-se que as avaliações das variáveis salivares e microbianas não forneceram diferenças de resultados que pudessem explicar as diferenças observadas nos três grupos, pois apresentaram discreta variabilidade entre os grupos. O acesso ao serviço odontológico regular e periódico parece ser fator importante na prevenção das cáries dentárias.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PIBIC/ PUCPR) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas.

Referências

1. Höfling JF. Contagens de microrganismos cariogênicos da saliva de escolares da região de Piracicaba. *Rev APCD* 1992;46:749-52.
2. Thylstrup A, Fejerskov O. *Cariologia Clínica*. São Paulo: Santos; 1995.
3. 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* 1993;27:292-7.
4. Lindquist B, Emilson CG. Dental location of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in humans harboring both species. *Caries Res* 1991;25:146-52.
5. Shklair IL, Keene HJ, Cullen P. The Distribution of *Streptococcus mutans* on the teeth of two groups of naval recruits. *Arch Oral Biol* 1974;19:199-202.
6. Walter RG, Shklair IL. *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active naval recruits. *J Dent Res* 1982;61:1229-32.
7. Mattar FN. Análise crítica dos estudos de estratificação sócio-econômica de ABAAbipeme. *Rev Administ* 1995;30:57-74.
8. Shklair IL, Keene HJ. A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1974;19:1079-81.
9. Azevedo RVP. O emprego da bacteriocinotipagem (mutacinotipagem) no rastreamento epidemiológico de estreptococos do grupo mutans [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1988.
10. Whittenbury R. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *J Gen Microbiol* 1964;35:13-26.
11. van Houte J, Lopman J, Kent R. The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. *J Dent Res* 1996;75:1008-14.
12. Hamada S, Tori M. Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surface. *Infect Immun* 1978;20:592-9.
13. Poulton R, Caspi A, Milne BJ, Thomson WM, Taylor A, Sears MR et al. Association between children's experience of socioeconomic disadvantage and adult health: a life-course study. *Lancet* 2002;360:1640-5.
14. Hobdell MH, Oliveira ER, Bautista R, Myburgh NG, Lalloo R, Narendran S et al. Oral diseases and socio-economic status (SES). *Br Dent J* 2003;194:91-6.
15. Hjern A, Grindefjord M. Dental health and access to dental care for ethnic minorities in Sweden. *Ethn Health* 2000;5:23-32.
16. Drummond BK. Preventive dental care for children and adolescents. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 2001;64:133-40.

17. Anderson M. Risk assessment and epidemiology of dental caries: review of the literature. *Pediatr Dent* 2002;24:377-85.
18. Oscarson N, Kallestal C, Fjelddahl A, Lindholm L. Cost-effectiveness of different caries preventive measures in a high-risk population of Swedish adolescents. *Community Dent Oral Epidemiol* 2003;31:169-8.
19. Barber LR, Wilkins EM. Evidence-based prevention, management, and monitoring of dental caries. *J Dent Hyg* 2002;76:270-5.
20. Powell V, Leroux BG, Martin JA, White BA. Identification of adult populations at high risk for dental caries using a computerized database and patient records: a pilot project. *J Public Health Dent* 2000;60:82-4.
21. O'Sullivan EA, Curzon ME. Salivary factors affecting dental erosion in children. *Caries Res* 2000;34:82-7.
22. Anderson P, Hector MP, Rampersad MA. Critical pH in resting and stimulated whole saliva in groups of children and adults. *Int J Paediatr Dent* 2001;11: 266-73.
23. Petti S, Hausen HW. Caries prediction by multiple salivary mutans streptococcal counts in caries-free children with different levels of fluoride exposure, oral hygiene and sucrose intake. *Caries Res* 2000;34:380-7.
24. Larmas M. Simple tests for caries susceptibility. *Int Dent J*. 1985;35:109-17.
25. Kiernick AM, Bachanek T, Klichowska-Palonka M. The activity of dental caries in students of the Faculty of Dentistry, the study with the use of microbiological and biochemical tests (Dentocult SM). *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska* 2002;57: 400-6.
26. Musser JM, Kroll JS, Moxon ER, Selander RK. Clonal population structure of encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1988;56:1837-45.
27. Mayer MPA, Bueno LC, Hansen EJ, Dirienzo JM. Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1999;67:1227-37.
28. Saarela M, Hannula J, Mattö J, Asikainen S, Alaluusua S. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Arch Oral Biol* 1996; 41: 821-6.
29. Alaluusua S, Mättö J, Gronroos L, Innilä S, Torkko H, Asikainen S et al. Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. *Archs Oral Biol* 1996;41:167-73.
30. Gronroos L, Alaluusua S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. *Caries Res* 2000;34:474-80.
31. Redmo-Emanuelsson IM, Carlsson P, Hamberg K, Bratthall D. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:1824-9.
32. Kreulen CM, de Soet HJ, Hogeveen R, Veerkamp JS. Streptococcus mutans in children using nursing bottles. *ASDC J Dent Child* 1997;64:107-11.
33. Marsh PD. Oral ecology and its impact on oral microbial diversity. In: Kuramitsu HK, Ellen RP, editors. *Oral bacterial ecology: The molecular basis*. Norfolk, UK: Horizon Scientific; 2000.
34. Li YH, Lau PCY, Lee JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J Bacteriol* 2001;183: 897-908.

35. Paddick JS, Brailsford SR, Kidd EA, Gilbert SC, Clarck DT, Alam S et al. Effect of the environment on genotypic diversity of *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus oralis* in the oral biofilm. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:6475-80.
36. Kö hler B, Birkhed D, Olsson S. Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries Res* 1995;29:402-6.
37. Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MP. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12 to 30-months-old children. *J Dent Res* 2000;79:1371-7.
38. Tanzer JM. Essential dependence of smooth surface caries on, and augmentation of fissure caries by, sucrose and *Streptococcus mutans* infection. *Infect Immun* 1979; 25:526-31.
39. van Palenstein Helderma WH, Matee MI, van der Hoeven JS, Mikx FH. Cariogenicity depends more on diet than the prevailing mutans streptococcal species. *J Dent Res* 1996;75:535-45.
40. Smith DJ, Taubman MA. Vaccines against dental caries infection. In: Levine MM, Woodrow GC, Kraper JB, Cobon GS, editors. *New Generation of vaccines*. New York: Marcel Dekker; 1997. p. 913-30.
41. Ooshima T, Matsumura M, Hoshino T, Kawabata S, Sobue S, Fujiwara T. Contributions of three glucosyltransferase to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 2001;80:1672-7.
42. Yamashita Y, Bowen WH, Kuramitsu HK. Molecular analysis of a *Streptococcus mutans* strain polymorphism in the tandem *gtfB* and *gtfC* genes. *Infect Immun* 1992; 60:1618-20.

Recebido em 10/03/2005; aceito em 15/04/2005
Received in 03/10/2005; accepted in 04/15/2005