



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LOANA PAULA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Candida spp.* E  
*Streptococcus spp.* NA DENTINA CARIOSA DE  
CRIANÇAS COM CÁRIE PRECOCE DA  
INFÂNCIA**

LOANA PAULA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Candida spp.* E  
*Streptococcus spp.* NA DENTINA CARIOSA DE  
CRIANÇAS COM CÁRIE PRECOCE DA  
INFÂNCIA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Colegiado do Curso de  
Odontologia da Universidade Estadual de  
Londrina.

Orientador: Prof. Ricardo Sérgio Couto de  
Almeida

Londrina  
2012

LOANA PAULA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Candida spp.* E  
*Streptococcus* NA DENTINA CARIOSA DE  
CRIANÇAS COM CÁRIE PRECOCE DA  
INFÂNCIA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Colegiado do Curso de  
Odontologia da Universidade Estadual de  
Londrina.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ricardo Sergio Couto de Almeida  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Farli Aparecida Carrilho Boer  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 05 de Dezembro de 2012.

Dedico este trabalho as pessoas que me apoiaram e me deram força para realizar este estudo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus que me iluminou durante esta jornada muito importante da minha graduação.

Ao meu orientador não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade, paciência, dedicação e sei que somente estes agradecimentos não são suficientes pelo trabalho que realizamos.

Aos amigos que me ajudaram e me deram apoio a cada vez que tive algum problema não deixando nunca desistir.

Gostaria de agradecer também as instituições que contribuíram para realização deste estudo, como a Bêbe Clínica, Educação Infantil Pastor Samuel de Souza, UBS Itaopã e o Centro de Aprendizagem e Integração de Cursos.

E a minha família que sempre esteve ao meu lado e que me proporcionou a realização e conclusão desta graduação.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê” (Arthur Schopenhauer).

OLIVEIRA, Loana Paula. **AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Candida spp.* E *Streptococcus ssp.* NA DENTINA CARIOSA DE CRIANÇAS COM CÁRIE PRECOCE DA INFÂNCIA.** 2012. 32 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

Assim como *Streptococcus mutans*, existe uma maior prevalência de *Candida albicans* na saliva de crianças com cáries, quando comparadas com crianças livres dessa doença. Entretanto, ainda não se sabe se *C. albicans* é um verdadeiro patógeno envolvido no processo cariioso, ou simplesmente um indicador de condições favoráveis para a cárie ou um componente estrutural da placa dentária. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de espécies do gênero *Candida* e *Streptococcus* de lesões cariosas de crianças de 1 a 5 anos, utilizando crianças livres de cáries como controle (coleta da placa dental do dente 51). Para isso, coletamos fragmentos de dentina cariada e placa dental adjacente à cárie coletada, dividindo as amostras em 2 grupos: cárie dentária e cárie precoce da infância. As amostras foram cultivadas em dois meios seletivos, BHI com 0,2 U/L de bacitracina (isolamento de *Streptococcus spp.*) e CHROMagar (isolamento de *Candida spp.*). Assim, foi detectada a presença de *Streptococcus spp.* em todas as amostras de cárie dentária e cárie precoce da infância e em 95% da placa dental de crianças livres desta doença. Em contraste, *C. albicans* foi isolada de 100% das amostras de cárie precoce da infância. Não houve a presença deste fungo em pacientes sem cárie e pacientes com cárie dentária apresentaram uma prevalência de 55,60%. Nossos resultados sugerem que este fungo esteja envolvido na patogenia da cárie precoce da infância, abrindo novos caminhos para investigação desta doença e o desenvolvimento de novos tratamentos. O presente trabalho possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina.

**Palavras-chave:** *Candida albicans*. *Candida spp.*. Cárie precoce da infância. *Streptococcus spp.*.

OLIVEIRA,Loana Paula. **EVALUATION OF THE PRESENCE OF *Candida spp.* AND *Streptococcus spp.* IN CARIOUS DENTIN OF CHILDREN WITH EARLY CHILDHOOD CARIES.** 2012. 32 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

### ABSTRACT

As *Streptococcus mutans*, there is a higher prevalence of *Candida albicans* in saliva of children with caries, when compared with children free of this disease. However, it is not known if *C. albicans* is a true pathogen involved in carious process, or simply an indicator of conditions favorable to caries or a structural component of the dental plaque. The objective of this study was to evaluate the presence of species of the genus *Candida* and *Streptococcus* in carious lesions in children from 1 to 5 years old, using children free from caries as control (dental plaque from tooth 51). Thus, carious dentin and dental plaque adjacent to this caries were collected and divided into 2 groups: dental caries and early childhood caries. The samples were grown on two selective media, BHI with 0.2 U/L of bacitracin (*Streptococcus spp.* isolation) and CHROMagar (isolation of *Candida spp.*). The presence of *Streptococcus spp.* was detected in all samples of dental caries and early childhood caries, while present in 95% of dental plaque from caries free children. In contrast, *C. albicans* was isolated from 100% of early childhood caries. Caries free patients showed no fungi isolation and dental caries showed a prevalence of 55.60% of *C. albicans*. Our results suggest that this fungus could be involved in the pathogenesis of early childhood caries, opening new paths for research of this disease and the development of new therapeutical tools.

**Key words:** *Candida albicans*. *Candida spp.*. Early childhood caries. *Streptococcus spp.*.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Procedimentos de coleta.....	20
<b>Figura 2</b> – Cultivo das amostras.....	21
<b>Figura 3</b> – Incubação e identificação das amostras.....	21
<b>Figura 4</b> – Imagem microscópica mostrando leveduras coradas por Gram.....	22
<b>Figura 5</b> – Imagem microscópica mostrando os estreptococos corados por Gram.	22

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Grupo controle: Placa dental do elemento 51.....	23
<b>Tabela 2</b> – Grupo cárie precoce da infância: lesão cariosa .....	23
<b>Tabela 3</b> – Grupo cárie precoce da infância: placa dental adjacente .....	23
<b>Tabela 4</b> – Grupo cárie dentária: lesão cariosa.....	24
<b>Tabela 5</b> – Grupo cárie dentária: placa dental adjacente.....	24

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*C. albicans*- *Candida albicans*

*S. mutans* – *Streptococcus mutans*

*C. tropicalis* – *Candida tropicalis*

*C. parapsilosis* – *Candida parapsilosis*

*C. glabrata* - *Candida glabrata*

*C. krusei*- *Candida krusei*

UBS- Unidade Básica de Saúde

PIC- Polissacarídeo Intracelular

PEC- Polissacarídeo Extracelular

GC - Grupo controle

GD – Grupo cárie dentária

GD1- amostra de cárie dentária com cárie precoce da infância com lesão cariiosa

GD2 - amostra de cárie dentária com placa dental

GP – Grupo cárie precoce da infância

GP1 - amostra com cárie precoce da infância com lesão cariiosa

GP2- amostra com cárie precoce da infância com placa dental

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1. Cárie dental .....	12
1.2. A bactéria cariogênica <i>Streptococcus mutans</i> .....	13
1.3. O Gênero <i>Candida</i> .....	14
1.4. O fungo patogênico <i>Candida albicans</i> .....	15
1.5. <i>Candida spp.</i> e a Cárie Precoce da Infância.....	15-17
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
<b>3 DESENVOLVIMENTO</b> .....	19
3.1 Materias e método .....	19
3.1.1 Procedimentos de Coleta.....	19
3.1.1.1 Cultivo e identificação das amostras.....	20-22
<b>4 RESULTADOS</b> .....	23-25
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	26-27
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	28
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	29-33

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1. Cárie dental

Na cavidade bucal, as superfícies dentais podem ser recobertas por depósitos microbianos, com espessura determinada de acordo com sua localização e tempo de formação, denominados biofilmes ou placa dental (MARSH ; NYVAD, 2003). O biofilme dental assim formado é composto por uma comunidade mista de micro-organismos que tende a se estabilizar com o passar do tempo. Essa homeostase bacteriana resulta de um processo dinâmico de interações microbianas e a atividade metabólica dos microorganismos causa flutuações de pH até mesmo em condições de repouso (sem carboidratos disponíveis na saliva) (MARSH, 1989). Tais flutuações de pH causam alterações na placa dental, resultando em um distúrbio no equilíbrio da interface dente e placa, levando a perda e ganho de minerais na superfície dental (MANJI *et al.*, 1991). Assim, quando os eventos de perda mineral são mais frequentes que o ganho mineral, devido ao acúmulo de ácidos liberados pela fermentação bacteriana de carboidratos da dieta, principalmente a sacarose, instala-se um processo de desmineralização do tecido dental, que culminará na formação da cárie dental (PINTO, 2000). Esta doença que atinge 88% dos brasileiros (Programa Saúde Bucal, Ministério da Saúde, 2003) é multifatorial, infecciosa e transmissível (FITZGERALD; KEYES, 1960). Além disso, ela é caracterizada por um processo crônico, que ocorre por meio da interação de quatro fatores: dieta, dente suscetível, microorganismos e o tempo (NEWBRUN, 1983).

Muitas bactérias do biofilme utilizam açúcares presentes na dieta (sacarose, glicose, frutose e lactose) para seu metabolismo e sobrevivência. Esses carboidratos são fermentados de modo direto, mas na presença de grandes quantidades, estes são armazenados na forma de polissacarídeos intra- (PIC) e extra-celulares (PEC). Os PEC formados na parede celular da bactéria, além de serem importantes na adesão bacteriana também contribuem para as propriedades de difusão da matriz da placa, aumentando a concentração de ácido na interface dente-biofilme. Por sua vez, o armazenamento de PIC possibilita à bactéria a produção de ácidos mesmo em fases de repouso, aumentando seu potencial cariogênico (JOHANSSON; BIRKHED, 1995).

## 1.2. A bactéria cariogênica *Streptococcus mutans*

A bactéria Gram positiva *Streptococcus mutans* foi reconhecida por muitos anos como o microorganismo predominante na etiologia da cárie dental de acordo com a “hipótese da placa específica” (WJ, LOESCHE, 1979).

Um estudo realizado na Islândia, onde foram coletadas cepas de *S. mutans* de indivíduos de diferentes idades, mostrou que isolados de *S. mutans* de indivíduos com cárie ativa foram capazes de aderir mais à superfície dental e causar mais descalcificação do esmalte *in vitro* quando comparados com isolados de indivíduos que estavam livres de cárie (W, HOLBROOK, M, MAGNUSDÓTTIR, 2012)

*S. mutans* é considerada uma bactéria homofermentativa, produtora de ácido láctico. Entretanto, quando há limitação de glicose e disponibilidade de outros carboidratos, esta bactéria pode realizar outros tipos de fermentação, gerando ainda acetato, formato, acetoína, e etanol. (YAMADA, CARLSSON, 1975).

Quando *S. mutans* usa essencialmente sacarose como substrato, os polissacarídeos extracelulares (PECs) são sintetizados (HAMADA e SLADE, 1980; BOWEN, 2002). Essa bactéria sintetiza uma mistura de alfa 1,3 glucanos insolúveis em água e alfa 1,6 glucanos solúveis, ao passo que produz beta 2,6 frutanos. Os PECs são em grande parte insolúveis, tem uma estrutura complexa (KOPEC *et al.*, 1997) e promovem uma adesão seletiva (SCHILLING e BOWEN, 1992;. VACCA-SMITH *et al.*, 1996), causando o acúmulo de grandes números de estreptococos cariogênicos sobre os dentes de seres humanos (ROLLA, 1989; MATTOS-GRANER *et al.*, 2000;. NOBRE DOS SANTOS *et al.*, 2002) e animais experimentais (KRASSE, 1965; FROSTELL *et al.*, 1967;. JOHNSON *et al.*, 1977). Além disso, o aumento de PEC causa uma maior porosidade da matriz da placa dentária, permitindo assim que o substrato possa se difundir para o esmalte superficial (DIBDIN e SHELLIS, 1988). Como resultado da difusibilidade aumentada do substrato, camadas mais profundas da placa dentária exibem menores valores de pH, devido ao metabolismo do açúcar por bactérias acidogênicas (ZERO *et al.*, 1992), aumentando assim o desenvolvimento de cáries dentárias (CURY *et al.*, 1997; MATTOS-GRANER *et al.*, 2000; NOBRE DOS SANTOS *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2005).

Recentemente, observou-se que biofilmes de *S. mutans* formados *in vitro* na presença de 20% (ou mais) de sacarose apresentaram menor pH quando incubados em meio sem carboidratos, em comparação com biofilmes formados sem sacarose (PERCHARKI *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2005; Aires *et al.*, 2006), o que poderia estar relacionado com o metabolismo de PICs. Em concordância com esses resultados, biofilmes desta bactéria formados na presença de sacarose apresentam maior concentração de PICs, quando comparados com biofilmes formados na ausência deste carboidrato (TENUTA *et al.*, 2006). Assim, o metabolismo de PICs por *S. mutans* poderia explicar o pH ácido da placa dental mesmo em fases de repouso (sem carboidratos disponíveis na saliva) e, conseqüentemente, um aumento da cariogenicidade da mesma. Assim, a capacidade de produzir PECs e acumular PICs, demonstrada por *S. mutans*, são importantes fatores cariogênicos desta bactéria.

### 1.3. O Gênero *Candida*

*Candida* é um gênero da família Candidaceae, pertencente à ordem Saccharomycetales, da classe Hemiascomycetes, do filo Ascomycota, do reino Fungi. Aproximadamente 150 espécies pertencem a este gênero, mas somente 13 espécies são capazes de causar infecções em seres humanos. Composto o grupo de espécies patogênicas estão: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida famata*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida inconspicua*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis* e *Candida viswanathii* (CALDERONE, 2002). Algumas dessas espécies (como *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*) são parte da microbiota normal da pele e superfícies mucosas em mais de 50% da população humana (SOLL, 2002) e a espécie mais frequentemente isolada é *C. albicans*, composto mais de 70% do total dos isolados (RUHNKE, 2002). Lay e Russel relataram que 6% dos recém-nascidos estudados por eles possuíam colonização oral por *Candida spp.*; com um mês após o nascimento, esta colonização aumentou para 79%, dentro da mesma população (LAY E RUSSEL, 1977).

#### 1.4. O fungo patogênico *Candida albicans*

Na maioria dos seres humanos, a levedura *C. albicans* existe como um organismo comensal do trato gastrointestinal (incluindo a boca) e vagina; entretanto, este fungo é capaz de causar infecções quando o equilíbrio da microbiota é perturbado (ex. antibioticoterapia de longa duração) ou quando o sistema imunológico do hospedeiro está comprometido. Existem duas formas principais de infecção: infecções superficiais da pele e mucosa, e candidíase invasiva, onde o fungo pode se disseminar pelo sistema sanguíneo e infectar praticamente todos os órgãos do hospedeiro (CALDERONE, 2002). Espécies de *Candida* são a causa mais frequente de infecções fúngicas invasivas em humanos. Estudos recentes tem demonstrado que *Candida* spp. são agora o terceiro microorganismo mais frequentemente isolado do sangue de pacientes com infecções hospitalares, sendo *C. albicans* a espécie mais isolada (aproximadamente 50%) (PERLROTH *et al.*, 2007). Além disso, até 90% dos indivíduos HIV positivos não tratados sofrem de infecções bucais por *Candida* (RUHNKE, 2002) e a maioria das mulheres terão pelo menos um episódio de candidíase vaginal no decorrer de suas vidas, sendo também *C. albicans* a espécie mais frequentemente isolada (SOBEL, 2002).

#### 1.5. *Candida* spp. e a Cárie Precoce da Infância

A cárie precoce da infância é definida como a presença de uma ou mais lesões cariosas (não cavitadas ou cavitadas), perda dental (relacionadas à cárie) ou superfícies dentais restauradas, em qualquer dente decíduo, em crianças com idade até 71 meses (DRURY *et al.*, 1999; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY, 2003). Ela é também conhecida por uma variedade de sinônimos: BBTD (Baby Bottle Tooth Decay), cárie por amamentação, síndrome da mamadeira noturna, síndrome da cárie de mamadeira, cárie em bebês e cárie de mamadeira. O mecanismo biológico envolvendo o quadro da doença cárie de mamadeira é basicamente o mesmo que envolve outros tipos de cárie (MILNES, 1996; REISINE; DOUGLASS, 1998). Múltiplos fatores de risco têm sido associados à cárie precoce da infância, incluindo má higiene oral, freqüente ingestão de carboidratos fermentáveis e baixo nível socioeconômico (MILNES, 1996). Vários estudos apresentam que a cárie de mamadeira se desenvolve a partir da associação



de mamadas sem controle, que ultrapassam o 1º ano da criança e em horários livres. Estas mamadas podem ser através da mamadeira ou peito. O aparecimento da lesão de cárie de mamadeira se dá também por alguns hábitos estimulados na criança, como oferecer chupetas adoçadas (PINTO, 1993; RAMOS, 1999; RIBEIRO *et al.*, 2004). A severidade da doença aumenta com a idade, podendo variar desde lesões de mancha branca a evidentes lesões de cárie e pode estar associada à sintomatologia dolorosa ou não, chegando às vezes a destruição completa do elemento dental (VEERKAMP, WEERHEIJM, 1995; MILNES, 1996). As crianças acometidas podem ter problemas oclusais, dificuldades para se alimentar, comprometimento do crescimento, apresentar baixo peso e estatura e traumas psicológicos (ACS *et al.*, 1992; AYHAN; SUSKAN; YILDIRIM, 1996; LOW; TAN; SCHWARTZ, 1999). Em relação aos aspectos epidemiológicos, a doença é um sério problema de saúde pública, sendo que sua prevalência é considerada elevada, principalmente em populações de baixo nível socioeconômico. No Brasil no período de 2000 a 2003 foi realizado um estudo nacional identificado como “SB Brasil: Condições de Saúde Bucal na População Brasileira 2010”, que entre as faixas etárias estudadas estimou que quase 56% das crianças apresentavam pelo menos um dente decíduo com experiência de cárie dentária (Projeto Saúde Bucal Brasil 2010).

A cárie dentária é reconhecida como uma doença bacteriana afetando os tecidos mineralizados dos dentes (MARSH, 1999; SELWITZ *et al.*, 2007; FEATHERSTONE, 2008). No entanto, recentemente, espécies de *Candida* tem sido associadas com a cárie dentária, sendo *C. albicans* a espécie mais prevalente (CARVALHO *et al.*, 2006; ROZKIEWICZ *et al.*, 2006; UGUNCAN *et al.*, 2007). A presença de *C. albicans* em biofilmes *in vitro* melhora a aderência de *S. mutans* (BARBIERI *et al.*, 2007) e Coulter e colaboradores (1993) sugeriram que o número elevado de espécies de *Candida* na cavidade bucal poderia ser considerado um indicador de risco de cárie. Além disso, a presença de *Candida spp.* na cavidade bucal está positivamente relacionada a má higiene bucal e a alta ingestão de carboidratos (CALVAC CORTELLI *et al.*, 2006). Ainda, Moreira e colaboradores (2001) relataram uma maior frequência de *Candida spp.* em superfícies oclusais de dentes em relação a superfícies mucosas.

Em um estudo feito na faculdade de odontologia de Araraquara (Unesp), *S. mutans* e *C. albicans* foram os microorganismos mais isolados da

dentina de crianças com cáries de mamadeira (83,3% e 70,8%, respectivamente). No entanto, *S. mutans* foi associada com a presença de cáries em geral, enquanto ocorreu uma maior frequência de *C. albicans* em crianças com cárie de mamadeira quando comparadas a crianças livres de cárie ou crianças com outros tipos de cárie (CARVALHO *et al.*, 2006). Corroborando este fato, Klinke e colaboradores (2009) demonstraram que a produção abundante de ácidos por *C. albicans in vitro* necessita de uma concentração de glicose 50 vezes maior do que a necessária para *S. mutans* e lactobacilos, sugerindo que a produção de ácidos por este fungo desempenha um papel importante na placa dentária quando a disponibilidade de açúcar na boca é alta. Ainda, estes autores demonstraram que alta concentração de glicose inibe a produção de ácidos por *S. mutans* e *lactobacilli*, sugerindo que *C. albicans* possa ser o responsável pela maior parte da acidificação do biofilme bucal quando há altas concentrações de glicose na boca.

Existem várias características deste fungo relacionadas com um possível potencial cariogênico. As bombas de prótons de *C. albicans* conferem a este fungo uma tolerância extraordinária a ácidos extracelulares, possibilitando seu crescimento até mesmo em pH 2,0 (BOWMAN AND BOWMAN, 1986). Adicionalmente, seu potencial acidogênico se reflete no fato de que este fungo secreta principalmente ácido pirúvico (pKa = 2,39), sendo este ainda mais potente do que o ácido láctico (pKa = 3,86) na diminuição do pH de um ambiente já intensamente acidificado (KLINKE *et al.*, 2009). Além disso, *C. albicans* é capaz de aderir a hidroxiapatita (CANNON *et al.*, 1995), formar biofilme e matriz extracelular *in vitro* (THEIN *et al.*, 2007), e ligar-se ao colágeno nativo ou desnaturado (MAKIHIRA *et al.*, 2002). Ainda, este fungo, pela secreção de aspartil proteases, é capaz de degradar o colágeno presente na dentina sob condições ácidas (HAGIHARA *et al.*, 1988).

Apesar das características descritas acima apontarem *C. albicans* como um potencial agente cariogênico, seu significado tem sido muitas vezes negado devido ao fato do número de fungos representar apenas uma pequena percentagem da microbiota total de lesões cariosas (KLINKE *et al.*, 2009).

## 2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de espécies do gênero *Candida* e *Streptococcus* de lesões cariosas de crianças de 1 a 5 anos, utilizando crianças livres de cáries como controle (coleta da placa dental do dente 51). Além disso, avaliamos a prevalência destes fungos e bactérias em lesões cariosas de crianças com cárie precoce da infância, comparando com lesões cariosas de crianças com outros tipos de cárie.

## 3 DESENVOLVIMENTO

### 3.1 MATERIAS E MÉTODO

O presente trabalho está inserido dentro do projeto “Caracterização Molecular e Biológica de Fatores que Participam na Formação de Biofilmes Bucais e Cáries *in vitro*: Interações entre *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*” (cadastrado na PROPPG: 07973), o qual possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (parecer 10247). Plataforma Brasil, CAAE: 01543012.0.0000.5231. As coletas foram realizadas (com as devidas autorizações) na Bebê Clínica, na Unidade Básica de Saúde - Itapoã, no Centro de Educação Infantil Pastor Samuel de Souza e no Centro de Aprendizagem e Integração de Cursos

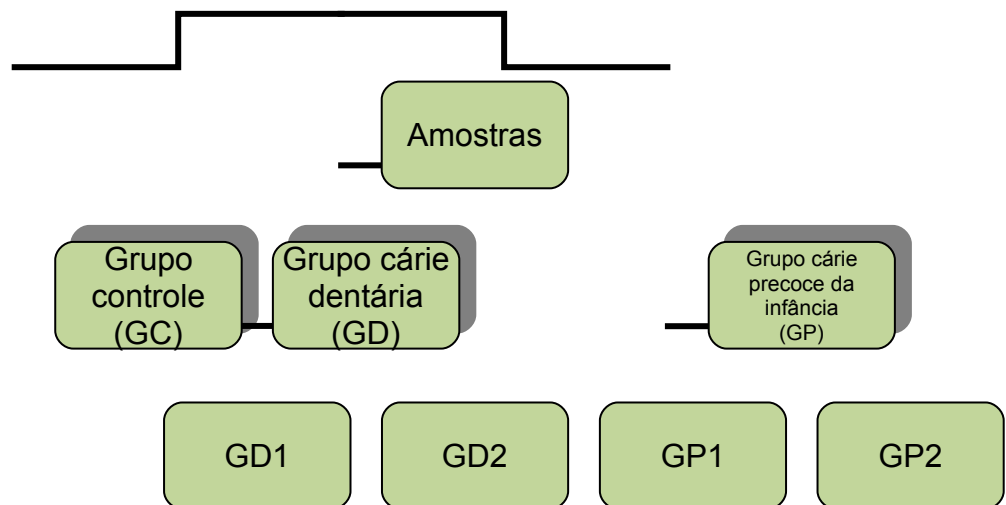
#### 3.1.1 Procedimentos de Coleta

As amostras foram divididas em 3 grupos: grupo controle, grupo cárie dentária e o grupo cárie precoce da infância. O grupo controle foi denominado GC no qual continham os pacientes livres de cárie. Neste grupo foi realizada a coleta da placa dental cervical do dente 51, utilizando um palito de dente estéril.

Já as amostras de cárie dentária foram chamadas de GD e o grupo cárie precoce da infância foi denominado CP. As amostras de fragmentos de lesão cariiosa foram coletadas somente recolhendo a zona necrótica e infectada (com cureta estéril) e denominamos como a subdivisão 1 e a placa dental (com palito de dente estéril) adjacente à cárie coletada chamada de 2. Depois da coleta foram guardadas em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, contendo 1 mL de solução salina (PBS) para manter a amostra viva até sua utilização no laboratório. Para cada amostra a placa dental adjacente foi armazenada em um tubo e a cárie dental em outro tubo.

Dessa forma GD ficou com duas subdivisões, GD1 que continha a lesão cariiosa e GD2 com a placa dental adjacente. O mesmo foi realizado para o grupo GP.

Figura.1- Procedimentos de coleta.



### 3.1.1.1 Cultivo e identificação das amostras

Somente os tubos com tecido cariado continham 3 pérolas de vidro (4 mm de diâmetro cada). Estes tubos foram centrifugados no vortex por 30 segundos para ocorrer colisão das pérolas e, conseqüentemente, ruptura do tecido. Uma alíquota de 0,1 mL foi removida de cada tubo (com placa ou cárie) e plaqueada sobre a superfície de um meio sólido de cultivo em placa de petri. Assim, cada

amostra foi cultivada em dois meios seletivos diferentes: (i) meio de Infusão de Cérebro e Coração (sigla do inglês, BHI) (Difco) com 0,2 U/L de bacitracina com o objetivo de selecionar *Streptococcus spp.* e (ii) meio CHROMagar *Candida* (Difco), seletivo para espécies de *Candida*.

Segundo instruções do fabricante, o meio CHROMagar *Candida* identifica até 5 espécies diferentes de acordo com a cor da colônia. Assim, colônias de *C. albicans* são verdes; de *C. tropicalis* são azuis; de *C. parapsilosis* são roxas; de *C. krusei* são rosas com bordas irregulares; e de *C. glabrata* são rosas com halo claro e bordas regulares.

Após plaqueamento as placas de BHI foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas e as placas de CHROMagar foram incubadas a 37°C sem CO<sub>2</sub> por 48 horas. Para confirmação, cada amostra foi corada por Gram e visualizada ao microscópio ótico (Figuras 4 e 5) e lida pelo menos por dois pesquisadores.

Figura 2. Cultivo das amostras

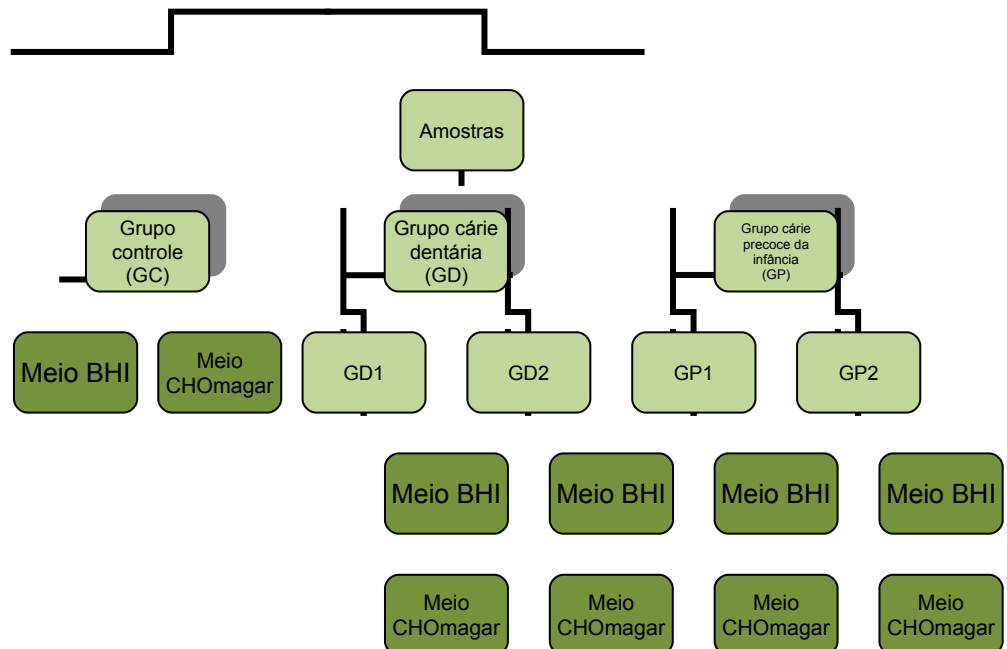


Figura 3. Incubação e identificação das amostras

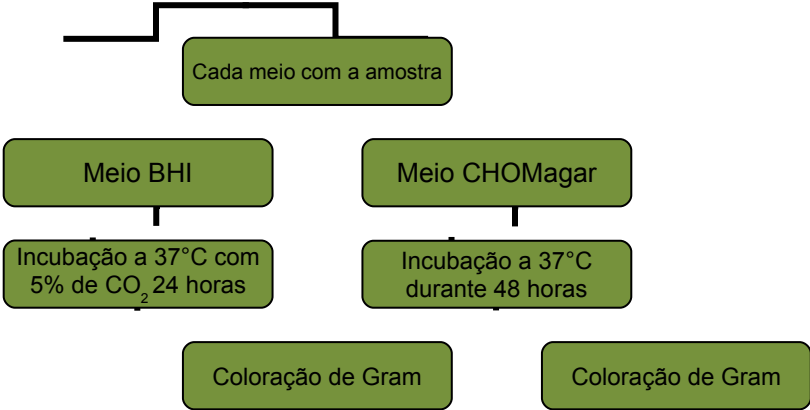


Figura 4. Imagem microscópica mostrando leveduras coradas por Gram

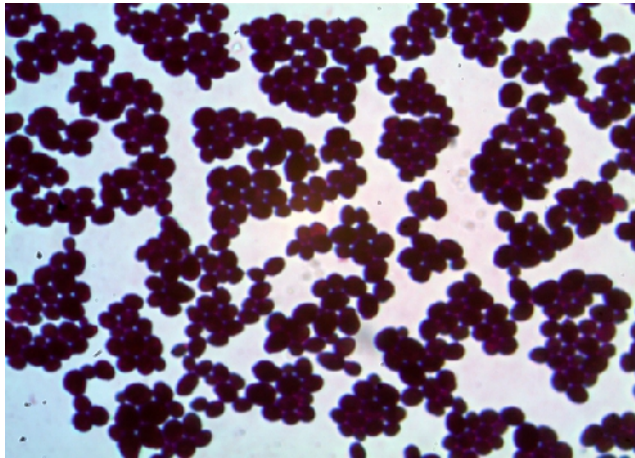
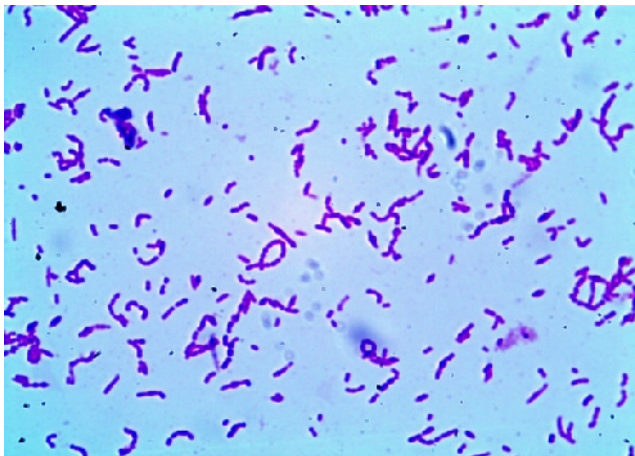


Figura 5. Imagem microscópica mostrando os estreptococos corados por Gram



## 4 RESULTADOS

Foram coletadas 49 amostras divididas em grupo controle, grupo cárie precoce da infância e grupo cárie dentária (outros tipos de cárie). O grupo controle, no qual só realizou a coleta da placa dental do elemento 51, teve um total de 20 amostras colhidas. E nestas amostras foram identificado somente estreptococos, com uma prevalência em 90% das amostras. Já *C. albicans* ou outras espécies do mesmo gênero não foram detectadas nas 20 placas dentais (Tabela 1).

O grupo cárie precoce da infância teve um total de 11 amostras. Destas foram coletadas a lesão cariada e a placa adjacente. Nas amostras de cárie dental foram identificados *C. albicans* em todas as amostras; em duas delas foram detectadas *C. tropicalis* e uma detectada *C. parapsilosis*; e estreptococos foram isolados em 100% delas (Tabela 2). Na placa dental adjacente a essas lesões cariosas somente duas amostras obtiveram a presença de *C. albicans* (18,18%) e em 10 das 11 amostras foram isolados estreptococos (90,91%). Não houve identificação de nenhuma outra espécie do gênero *Candida* nas placas adjacentes (Tabela 3).

A coleta do terceiro grupo, nomeado como cárie dentária, foi também dividido em lesão cariada e placa adjacente, totalizando 18 amostras de cada. Na cárie dental, *C. albicans* foi isolado em 55,60% das amostras, enquanto quatro tecidos cariados demonstraram a presença de duas *C. tropicalis*, uma *C. glabrata* e uma *C. parapsilosis* totalizando estas outras espécies em 22,22%. Por sua vez, estreptococos foram isolados em 17 amostras (94,44%) (Tabela 4). Já na placa dental adjacente a lesão cariada, somente duas demonstraram a presença de *C. albicans* (11,11%), uma amostra tinha *C. tropicalis* (5,6%), e 16 demonstram a presença de estreptococos (88,89%) (Tabela 5).



TABELA 1- Grupo controle: Placa dental do elemento 51

Micro-organismo	Número de amostras (n=20)	Prevalência (%)
<i>C. albicans</i>	0	0
outra espécie	0	0
estreptococos	18	90

TABELA 2- Grupo cárie precoce da infância: lesão cariosa

Micro-organismo	Número de amostras (n=11)	Prevalência (%)
<i>C. albicans</i>	11	100
<i>C.tropicallis</i>	3	27,27
estreptococos	11	100

TABELA 3- Grupo cárie precoce da infância: placa dental adjacente

Micro-organismo	Número de amostras (n=11)	Prevalência (%)
<i>C. albicans</i>	2	18,18
Outra espécie	0	0
estreptococos	10	90,91

TABELA 4- Grupo cárie dentária: lesão cariosa

Micro-organismo	Número de amostras (n=18)	Prevalência (%)
<i>C. albicans</i>	10	55,60
<i>C.tropicalis</i> , <i>C.glabrata</i> e <i>C.parapsilosis</i>	4	22,22
estreptococos	17	94,44

TABELA 5- Grupo cárie dentária: placa dental adjacente

Micro-organismo	Número de amostras (n=18)	Prevalência (%)
<i>C. albicans</i>	2	11,11
<i>C.tropicallis</i>	1	5,60
estreptococos	16	88,89

## 5 DISCUSSÃO

A cárie da infância é um sério problema de saúde pública e seu principal agente etiológico é a bactéria cariogênica *S. mutans* (Projeto SB Brasil 2003, 2005; Klinke *et al.*, 2009). Os resultados encontrados aqui em relação a presença de *Streptococcus spp.* na cárie dental e na placa dental de crianças demonstram não haver diferença na prevalência deste gênero bacteriano tanto em relação ao local da coleta (placa ou cárie), quanto em relação ao tipo de cárie coletada. Além disso, uma prevalência semelhante também foi encontrada em pacientes livres de cárie (90%). De modo similar, de Carvalho e colaboradores (2006) obtiveram em torno de 80% de prevalência *S. mutans* nos grupos citados acima. Entretanto, apenas 19% das crianças livres de cárie apresentaram esta bactéria na placa dental do dente 51. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que aqui isolamos bactérias do gênero *Streptococcus*, enquanto que no artigo citado, a espécie *S. mutans* foi isolada. Assim, outras espécies não-*mutans* podem estar presentes na placa dental de crianças livres de cárie, causando uma prevalência de 90%.

Nossos resultados demonstram que *C. albicans* não está presente na placa dental do dente 51 de crianças livres de cárie. Em concordância com esse resultado, outros autores encontraram uma baixa prevalência deste fungo tanto na placa do dente 51 (3 amostras de um total de 21, de Carvalho *et al.*, 2006) quanto em swabs orais (4 amostras de um total de 50, Raja *et al.*, 2010) de crianças livres de cárie. Do mesmo modo, encontramos prevalências de 18,18% (2 de um total de 11 amostras) e 11,11% (2 de um total de 18 amostras) deste fungo nas placas adjacentes a cáries de mamadeira e outros tipos de cáries, respectivamente. Como o fungo foi encontrado com uma frequência muito maior nas lesões cariosas (100% e 55,6%), podemos sugerir que existem mais condições favoráveis à colonização de *C. albicans* no tecido carioso do que na placa dental. Além disso, tais condições poderiam estar presentes em maior intensidade e/ou quantidade em dentes que sofram de cárie precoce da infância, um vez que *C. albicans* foi encontrado em todas as nossas amostras de cárie de mamadeira e em 70,8% das amostras colhidas por de Carvalho e colaboradores (2006).

O meio *CHROMagar* utilizado para identificar espécies de *Candida* mostrou que *C. albicans* é mais freqüente do que outras espécies. No

grupo cárie precoce da infância somente 3 amostras cresceram *C. tropicalis* e em sua placa adjacente não houve outras espécies de *Candida*. Já no grupo cárie dentária, a lesão cariosa mostrou além de *C. albicans* a presença de 22,22% de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* e na sua placa adjacente somente uma revelou a presença de *C. tropicalis*.

Um artigo publicado em 2007 por Maijala e colaboradores analisou 10 dentes humanos com lesões cariosas por meio das colorações de Gram e Giemsa. Para identificar *C. albicans* nas lesões, eles utilizaram uma coloração de ácido periódico de Schiff (PAS) e uma marcação do fungo por imuno-histoquímica. Trinta seções foram utilizadas para cada coloração (no total 120 seções). Os resultados encontrados mostram que apenas 30 seções foram marcadas fracamente, com algumas células marcadas sobre a superfície da lesão. No entanto, a identificação positiva do fungo, com base na morfologia das células, não foi possível, concluindo que *C. albicans* não está na dentina cariosa e invalidando sua possível etiologia na cárie. Porém nosso estudo mostrou a presença deste fungo tanto na lesão de cárie precoce da infância quanto em cárie dentária.

Apesar dos novos resultados apontarem *C. albicans* como um potencial agente etiológico da cárie de mamadeira, seu significado tem sido muitas vezes negado devido ao fato do número de células fúngicas representar apenas uma pequena porcentagem da microbiota total de lesões cariosas (KLINKE *et al.*, 2009). Entretanto, deve-se levar em consideração o fato de que a biomassa fúngica é muito maior do que a de bactérias como *Streptococcus spp.*, e que o potencial acidúrico e acidogênico de *C. albicans* possa desempenhar um papel importante na lesão cariosa quando altas quantidades de carboidratos estão disponíveis (KLINKE *et al.*, 2009).

## **6 CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a hipótese de que o fungo patogênico *C. albicans* participa ativamente na formação e desenvolvimento da cárie precoce da infância, abrindo novos caminhos para investigação desta doença e o desenvolvimento de novos tratamentos.

## 7 REFERÊNCIAS

AYHAN, H. Influencing factors of nursing caries. J Clin Pediatr Dent, Birmingham, 1996, 20(4): 313-316.

BOWMAN, B.J, BOWMAN, E.J. H<sup>+</sup> -ATPases from mitochondria, plasma membranes, and vacuoles of fungal cells. J Membr Biol, 1986, 94: 83-97.

BUCHENER,T, FEGELER, W, BERNARDTB,H, BROCKMEYER, N, DUSWALD, K.H, HERRMAN, M,D, JEHN, U, JUST-NUBLING,G, KARTHAUS M. MASDCHMEYE,G, MULLER, F.M,MULLER, J,RITTER,ROSS,N, RUHNKE, M, SCHMALRECK, A. R, SCHWARZE, R, SHCWESINGER,G, SILLING, G; Tratamento de infecções graves de *Candida* em pacientes de alto risco, na Alemanha: consenso formado por um grupo de pesquisadores interdisciplinares. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2002 May, 21(5): 337-52.

CANNON, R.D, NAND, A.K, JENKINSON,H.F: Adherence od *Candida albicans* to human salivary components adsorbed to hydroxylapatite.Microniology, 1995, 141: 213-219.

CARVALHO, F.G, SILVA, D.S, HEBLING, J, SPOLIDORIO, L.C, SPOLIDORIO, D.M. Presence of *mutans streptococci* and *Candida spp.* in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. Arch Oral Biol,2006 Nov, 51(11): 1024-8.

COULTER, W.A, MURRAY, S.D, KINIRONS, M.J.The use of a concentrated oral rinse culture technique to sample oral *Candida* and *lactobacilli* in children, and the relationship between *candida* and *lactobacilli* levels and dental caries experience: a pilot study. In J Paediatr Dent, 1993, V:3 ,17-21.

CURY,J.A, REBELLO, M.A, DEL BEL CURY ,A.A. *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. Caries Res 1997;31:356–360.

CHOI, J, SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment.Perlroth . Med Mycol. 2007 ;45(4):321-46.

DIBDIN,G.H, SHELLIS, R.P. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. J Dent Res 1988;67:890–895.

DRURY, T. F.; HOROWITZ, A. M.; ISMAIL, A. I.; MAERTENS, M. P.; ROZIER, R. G.; SELWITZ, R. H. Diagnosing and reporting Early Childhood Caries for research purposes. A report of a workshop sponsored by the National Institute of Dental and Craniofacial Research, the Health Resources and Services Administration, and the Health Care Financing Administration. J Public Health Dent, Raleigh, 1999, v. 59, n. 3, p. 192-197.

FITZGERALD, R. J.; KEYES, P. H. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. J. Am. Dent. Assoc., Chicago, v. 61, no. 1, p. 9-19, July 1960.

HAMADA, S., SLADE, H.D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 1980;44:331–384.

HAGIRA, Y, KAMINISHI, H, CHO, T, TANAKA, M, KAITA, H: Degradation of human dentine collagen by an enzyme produced by the yeast *Candida albicans*. Arch Oral Biol 1988;33:617-619.

HOLBROOK, W. - Studies on strains of *Streptococcus mutans* isolated from caries-active and caries-free individuals in Iceland- J Oral Microbiol. 2012; 4: 10.3402/jom.v4i0.10611.

JOLY, S, PUJOL, C, SOLL, DR. Alterações microevolucionárias e as translocações cromossômicas são mais frequentes em loci RPS em *Candida dubliniensis* que em *Candida albicans*. Infect Genet Evol . 2002 , (1) :19-37

JOHANSSON, I.; BIRKHED, D. A dieta e o processo cariogênico. In: Thylstrup, A.; Fejerskov, O. Cariologia clínica 2 ed. São Paulo: Santos , 1995, p. 283-310.

KOPEC, L.K, VACCA-SMITH, A.M, BOWEN, W.H. Structural aspects of glucans formed in solution and on the surface of hydroxyapatite. Glycobiology 1997;7:929–934.

KLINKE .T; GUGGENHEIM .B; KIIMM.W; THURNHEER. T. Dental Caries in Rats Associated with *Candida Albicans* 2011;45:100-106.

KRASSE, B. The effect of caries-inducing streptococci in hamsters fed diets with sucrose or glucose. Arch Oral Biol 1965;10:223–226.

LAY, K.M, RUSSEL, C. *Candida* species and yeasts in mouths of infants from a special care unit of a maternity hospital.. Arch Dis Child. 1977 (10):794-6.

LOESCHE, W.J. Aspectos clínicos e microbiológicos dos agentes quimioterápicos utilizados de acordo com a hipótese da placa específica. Res J Dent. De 1979; 58 . :2404-12.

MANJI, F. The epidemiological features of dental caries in African and Chinese populations: implications for risk assessment. In: Johnson N.W. Risk markers of oral diseases, v. 1. Dental caries. Markers of high and low risk groups and individuals. Cambridge: Cambridge University Press, 1991, p. 62-69.

MARSCH, P. D., NYVAD, B. The oral microflora and biofilms on teeth. In: Fejerskov O., Kidd E. A. M. Dental Caries, London: Blackwell Munksgaard, 2003, p. 30-48.

MILNES, A. R. Description and epidemiology of nursing caries. J Public Health Dent, Raleigh, v. 56, n. 1, p. 38-50, 1996.

MOREIRA, A.C.G.S. *et al.* Prevenção da Cárie de Mamadeira. Revista Gestão & Saúde, Curitiba, 2011. v. 2, n. 2, p. 24-33.

NEWBRUN, E. Cariology. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1983.

PECHARKI, G.D, CURY, J.A, PAES LEME, A.F, TABCHOURY, C.P, DEL BEL CURY, A.A., ROSALEN, P.L, *et al.* Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization *in situ*. Caries Res 2005;39:123–129.

PINTO, A.C.G. Odontopediatria, 4ª ed, São Paulo, LS Santos, 1993, p 356, 357, 360, 363, 366, 374, 375.

ROLLA, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. Scand J Dent Res 1989;97:115–119

SCHILLING, K.M, BOWEN, W.H. Glucans synthesized *in situ* in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. Infect Immun 1992;60:284–295.

TENUTA, L.M.A, DEL BEL CURY, A.A, BORTOLIN, M.C, VOGEL, G.L, CURY, J.A. Ca, Pi, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. J Dent Res 2006;85:834–838.

THEIN, Z.M, SENEVIRATNE, C.J., SAMARANAYAKE, Y.H , SAMARANAYAKE, L.P.- Community lifestyle of candida in mixed biofilms: a mini review. Mycoses 52, 467-475, 2009.

VEERKAMP, J. P., WEERHEIJM, K. L. Nursing-bottle caries:the importance of a development perspective. ASDC J Dent Child, Chicago, 1995, v. 62, n. 6, p. 381-386.

ZERO, D.T. Adaptations in dental plaque. In: Bowen, WH.; Tabak, LA., editors. Cariology for the nineties.Rochester, NY: University of Rochester Press; 1993. p. 333-350.