

Microbiota estreptocócica associada com a formação inicial da placa dental

Streptococci microbiota associated with initial formation of dental plaque

PAULO FERNANDO DE ALMEIDA¹, MÔNICA PEREIRA FRANCA¹, SIMONE PEIXOTO SANTOS², RICARDO SOEIRO MOREIRA³, URBINO DA ROCHA TUNES⁴

¹ Professor de Microbiologia. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

² Bolsista PIBIC-CNPq. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

³ Médico. Ministério da Defesa

⁴ Professor de Periodontia. Faculdade de Odontologia. Fundação Bahiana para o Desenvolvimento da Ciência

Resumo

A identificação e quantificação dos estreptococos que iniciam a colonização das superfícies dos dentes no biofilme complexo da placa dental, bem como a compreensão das relações funcionais entre eles e outros membros são fundamentais para avaliar e, possivelmente, controlar os processos que essa comunidade inicial desempenha. Placas bacterianas foram asépticamente removidas de dentes de pessoas sadias e experimentalmente inoculadas em unidades dentárias esterilizadas e previamente cobertas com fluido oral estéril. Cada unidade dentária (UD) inoculada foi incubada a 37°C em uma câmara úmida. Após a formação da placa, a UD foi colocada em uma solução desagregadora da placa (SD) constituída de 0,1% de água peptonada, 0,1% de Tween 80 e 0,5% de areia calcinada (p/v). A UD foi submetida sucessiva e progressivamente à agitação em cinco velocidades controladas. Imediatamente após cada agitação, alíquotas foram coletadas e diluídas em tampão fosfato estéril, pH 7,2. Após cada coleta das alíquotas e antes de nova agitação, a UD era lavada em solução PBS estéril e novamente imersa em nova SD. Experimentos *in vivo* foram também efetuados, em unidades dentárias recentemente extraídas, usando a mesma técnica. Alíquotas das diluições foram semeadas na superfície de meios apropriados por disseminação usando uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 37°C em anaerobiose por 48 horas, quando, então, efetuavam-se as contagens total e diferencial das colônias. Cada tipo colonial era subcultivado e submetido a testes padrões para identificação bacteriana. De um total de 86 culturas de *Streptococcus* estudadas, 40,7% foram identificadas como *S. sanguis*, 37,2% como *S. oralis*, 8,1% como *S. mutans*, 7,0% como *S. gordonii* e 7,0% como outros estreptococos. Análises das culturas isoladas da última velocidade de agitação mostraram que, nos experimentos *in vitro*, somente *S. oralis* (66,7%) e *S. sanguis* (33,3%) estavam presentes. No experimento *in vivo*, os *S. sanguis* (56,5%) predominaram, seguidos do *S. oralis* (21,7%), *S. mutans* (15,2%) e outros estreptococos (6,5%). Os experimentos efetuados para verificar a capacidade de adesão de sete culturas dos estreptococos isolados mostraram que somente uma cepa de *S. oralis* e uma cepa de *S. sanguis* aderiram às superfícies dos dentes.

Prof. Paulo Fernando de Almeida
Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de
Microorganismos
Departamento de Biointeração
Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Bahia
Av. Reitor Miguel Calmon s/n Vale do Canela
40.110-100 Salvador, Bahia, Brasil
e-mail: pfa@ufba.br

Palavras-chave

Estreptococos orais, placa dental, aderência, biofilme oral

Introdução

Ao longo da vida, as superfícies de interface do corpo são expostas à colonização por uma grande variedade de microrganismos. A renovação constante das superfícies por descamação previne o acúmulo de grandes quantidades de microrganismos. Na cavidade oral, entretanto, os dentes apresentam uma superfície dura não descamativa que favorece o desenvolvimento de grandes depósitos bacterianos (LANG et al., 1997). No contexto do sistema estomatognático, esses depósitos bacterianos são denominados de placa dental ou placa bacteriana e, recentemente, biofilme oral. A colonização primária é feita predominantemente por cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos, especialmente por espécies de *Streptococcus*. O gênero *Streptococcus* compreende muitas espécies de cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, comensais e patogênicos que colonizam a pele e membranas mucosas dos tratos respiratório, genitourinário e canal alimentar de humanos e outros animais mamíferos (COLE et al., 1999). Os estreptococos alfa e não hemolíticos são as espécies pioneiras na colonização do intestino grosso e da boca (PEARCE et al., 1995; SMITH et al., 1993; TAPPUNI; CHALLACOMBE, 1993). Os estreptococos *viridans* compreendem uma grande proporção da microbiota comensal da cavidade bucal (BOWDEN; ELWOOD; HAMILTON, 1979) e diferentes espécies desses estreptococos colonizam nichos distintos dentro da cavidade oral (MARCOTTE; LAVOIE, 1998). Por exemplo, *Streptococcus mitis* biovar 1, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus salivarius* são as espécies predominantes das membranas mucosas e da língua do homem (PEARCE et al., 1995; SMITH et al., 1993; TAPPUNI; CHALLACOMBE, 1993). Por outro lado, o *S. oralis* é observado quase que exclusivamente nos dentes e o *Streptococcus sanguis* é o estreptococo predominante da mucosa bucal (FRANDBSEN; PEDRAZZOLI; KILIAN, 1991). A microbiota indígena da boca e outras cavidades permanece em um estado de homeostase entre si e com o hospedeiro, exceto quando há alterações substanciais do ambiente, quando a superfície

mucosa sofre soluções de continuidade ou quando o sistema imune está comprometido (BOWDEN; ELWOOD; HAMILTON, 1979). No entanto, na teoria da ecologia da placa, os membros constituintes do biofilme da placa são considerados benéficos para o hospedeiro, pois desempenham papel de proteção contra a colonização por espécies exógenas ou até mesmo produzindo substâncias como bacteriocinas, surfactantes e H_2O_2 , que possuem efeitos antagônicos ao estabelecimento de *S. mutans* e lactobacilos, os principais agentes cariogênicos (HILLMAN; SOCRANSKY, 1990).

As bactérias na placa estão geralmente ligadas a uma película orgânica de natureza salivar formada pela adsorção seletiva de glicoproteínas salivares pela hidroxiapatita. Classicamente, considera-se a formação da película adquirida (PA) como o primeiro estágio para o desenvolvimento da placa. A película é um filme condicionante que altera a carga e a energia livre de superfície, aumentando a eficiência da adesão (MARSHALL, 1992). A PA é constituída de uma mistura complexa de substâncias incluindo proteínas (albumina, lisozima e proteínas ácidas contendo muitos resíduos de prolina), glicoproteínas (lactoferrina, IgA, amilases), fosfoproteínas, lipídios, mucinas e ácido siálico (MARCOTTE; LAVOIE, 1998), servindo, portanto, como receptores e fonte de nutrientes para os colonizadores primários. As bactérias aderem, de forma variável, a estas superfícies que compõem a PA. Algumas possuem estruturas específicas de adesão, como fímbrias e polímeros extracelulares, que permitem uma rápida adesão ao contato. Outras bactérias necessitam de uma exposição mais prolongada para unirem-se firmemente (MARSHALL, 1992).

Recentemente, mostrou-se que, 3 a 8 horas após a limpeza adequada dos dentes, cerca de 61% a 78% da microbiota que se estabelece na película adquirida é constituída por espécies de estreptococos (NYVAD; KILIAN, 1990), especificamente *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. oralis* (previamente *S. mitior* e *S. sanguis* II), *S. gordonii* (previamente considerada uma subpopulação de *S. sanguis*, dentre outros). *S. sanguis*, *S. mitis* e

S. oralis compreendem 95% dos estreptococos dessa fase inicial (NYVAD; KILLIAN, 1987). *S. mutans* tanto pode estar ausente como presente em baixos números (LINDHE, 1989). Durante muitos anos, acreditou-se que os estreptococos do grupo *mutans* constituíam grande parte de microbiota inicial, graças à sua capacidade de produzir, a partir da sacarose, polissacarídeos extracelulares com propriedades de adesão. As interações estabelecidas entre as bactérias e as superfícies dos dentes através de adesinas bacterianas são tão específicas que os colonizadores primários podem co-agregar-se com as bactérias adjacentes, mas não com as bactérias que colonizam a placa posteriormente (KOLENBRANDER et al., 1998), sugerindo uma organização espacial específica na formação dos biofilmes orais. Estas interações se formam mesmo com bactérias mortas e podem ser inibidas por certos açúcares, sugerindo a presença de substâncias similares às lectinas nas bactérias orais (CISAR et al., 1995). Estas lectinas reconheceriam estruturas constituídas de carboidratos específicos (glicoproteínas) na PA das superfícies dentárias (NYVAD; KILLIAN, 1990). Estudos recentes mostraram que muitas dessas adesinas são proteínas, aminoácidos dos ácidos lipoteicóicos, polissacarídeos e lipoproteínas, sendo que estas últimas, surpreendentemente, participam dos sistemas de transporte de nutrientes (KOLENBRANDER et al., 1998; KOLENBRANDER et al., 1999). O cálcio também tem participação importante na aderência inicial e nos fenômenos de co-agregação (ROSE, 2000). Os bastonetes Gram-positivos, principalmente *A. viscosus* e *A. naeslundii*, constituem pequena proporção dessa microbiota inicial. Posteriormente, esses organismos aumentam gradualmente e, eventualmente, superam em número os estreptococos, os quais podem representar apenas 45% da microbiota. Receptores de superfícies dos cocos e bastonetes Gram-positivos facultativos permitem a aderência (co-agregação) subsequente de microrganismos Gram-negativos com pouca capacidade de aderir diretamente à película, como, por exemplo, cocos Gram-negativos (*Veillonella*), que aumentam rapidamente para 20%. Fusobactérias e outras bactérias anaeró-

bias Gram-negativas podem aderir também dessa forma, entretanto, compreendem apenas 5% do total da comunidade intermediária. Nesta fase, o microambiente é favorável para o estabelecimento de *S. mutans* e *S. sobrinus*, os quais se aderem aos colonizadores intermediários. Os polissacarídeos produzidos por estes organismos atuam como um cimento, mantendo as células aderidas entre si, formando o ecossistema da placa dental. Como nesta etapa a placa não é muito permeável à saliva, os ácidos formados pelo metabolismo desses microrganismos não podem ser diluídos ou neutralizados, ocorrendo a desmineralização do esmalte, produzindo a lesão que inicia a cárie (JENKINSON, 1994). Na maioria das co-agregações estudadas em detalhe, as duas espécies de bactérias envolvidas no processo pertencem a gêneros diferentes (co-agregação intergenérica). Este fato confere um aspecto de “espiga de milho”, onde se tem, por exemplo, a associação de *Streptococcus sanguis* e *Actinomyces* ou *Veillonella* e *Actinomyces*, característica de uma placa madura (LISTGARTEN; MAYO; AMSTERDAM, 1973). À medida que a camada da placa aumenta em espessura, em consequência do metabolismo desses organismos, o potencial redox cai, favorecendo os microrganismos anaeróbios, permitindo o desenvolvimento de um grande número de bastonetes Gram-negativos (KENNY; ASH, 1969). Após estabelecida a comunidade clímax, tornam-se evidentes as espiroquetas (LANG et al., 1997).

Este estudo foi conduzido para identificar os estreptococos envolvidos com a aderência inicial às superfícies dos dentes e determinar experimentalmente se representantes das cepas isoladas dos modelos experimental e natural são capazes de aderir às superfícies dos dentes.

Materiais e métodos

Estudo *in vitro* da microbiota estreptocócica associada com a formação inicial da placa dental

O inóculo para a reprodução experimental da placa dental foi obtido de estudantes de Odontologia da Universidade Federal da

Bahia, previamente submetidos a uma profilaxia com remoção completa das placas dentárias, verificada com solução de eritrosina. Os estudantes foram orientados a não efetuar higiene oral por 48 horas. Após a formação das PDs, as mesmas foram removidas assepticamente, usando-se curetas estéreis e inoculadas diretamente nas superfícies vestibular e lingual das unidades dentárias (UDs), num total de cinco, previamente esterilizadas e cobertas com líquido bucal estéril obtido dos próprios alunos. As superfícies inoculadas foram cobertas com água peptonada (0,1%) e solução de sacarose (0,5%) esterilizadas por filtração. As UD's foram colocadas em uma placa de Petri. O modelo foi incubado a 37°C em uma câmara úmida por 3 a 48 horas, para permitir a formação da placa dental, conforme Almeida et al. (1995).

Estudo *in vivo* da microbiota estreptocócica que inicia a formação da placa dental

Experimentos *in vivo* foram realizados analisando a porção coronária de unidades dentárias (CUD) obtidas assepticamente por odontosecção de cinco unidades dentárias de pacientes adultos com indicação para exodontia, em um posto de saúde da cidade do Salvador. As CUDs foram colocadas em tubos de rosca contendo PBS (pH 7,2) estéril e enviadas ao Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos, onde foram imediatamente submetidas às análises microbiológicas.

Preparação das amostras para os experimentos *in vivo* e *in vitro*

As UD's com placas e as CUDs dos experimentos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, foram imersas isoladamente em dez mililitros de uma solução desagregadora (SD) constituída de água peptonada a 0,1%, Tween 80 a 0,1% e areia calcinada a 0,5%. Os tubos contendo as UD's e as CUDs foram submetidos, sucessiva e progressivamente, à agitação em cinco velocidades controladas, num agitador tipo Vortex. Após cada agitação, alíquotas de 1,0 mililitro foram imediatamente colhidas e submetidas à diluição decimal seriada com PBS estéril, pH 7,2. Após cada coleta das alíquotas e antes de

cada agitação, as UD's e CUDs eram lavadas em solução PBS estéril e novamente imersas em um novo tubo contendo nova SD.

Isolamento e contagens bacterianas

Três alíquotas de 0,3 mililitro e uma de 0,1 mililitro, em duplicata, das diluições foram semeadas na superfície de ágar *mitis-salivarius* (Difco) suplementado com 1,0% de sacarose, com auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas inoculadas foram incubadas a 37°C em jaras de anaerobiose, cuja atmosfera foi substituída por uma mistura gasosa de 90% de N₂ e 10% de CO₂. As placas foram examinadas após 48 horas, efetuando-se as contagens total e diferencial das colônias originárias das amostras submetidas à última velocidade de agitação em que o crescimento bacteriano ainda ocorria. Cerca de três colônias de cada tipo foram subcultivadas em caldo de infusão de cérebro e coração (Difco) ou caldo Todd Hewitt (Difco) e submetidas a técnicas bacteriológicas padronizadas, usando os meios de tioglicolato sem glicose e sem indicador (Difco), como também pela técnica sugerida por Tappuni e Challacombe (1993), usando como meio basal o caldo púrpura de bromocresol (Difco), enriquecido com 5,0% de soro equino (Difco). A identificação dos microrganismos foi efetuada segundo o **Manual** de Bergey (HARDIE, 1986).

Indução *in vitro* do potencial de adesão dos estreptococos isolados

Cepas bacterianas e preparação dos inóculos

Sete cepas de estreptococos, sendo duas de *S. oralis*, duas de *S. sanguis*, uma de *S. mutans*, uma de *S. gordonii* e uma cepa de um estreptococo não identificado foram utilizadas para os experimentos. As culturas foram ativadas em caldo APT (Merck) em atmosfera anaeróbia a 37°C por 24 horas. A concentração celular foi determinada através da contagem em placas utilizando ágar de infusão de cérebro e coração (Difco) incubados em atmosfera anaeróbia a 37°C por 48 horas. O inóculo foi preparado diluindo cada cultura, de modo a obter, aproximadamente, 1.000 unidades formadoras de colônias (UFC) de cada estreptococo por mililitro.

Experimento de adesão

Um mililitro de cada inóculo foi colocado em tubos de 20 x 200 mm, com tampas de rosca, contendo 2,0 mililitros de água peptonada a 0,1%. Em seguida, uma UD estéril previamente coberta com líquido bucal estéril, para cada experimento, foi cuidadosa e assepticamente colocada no tubo citado acima, onde permaneceu por 4 horas a 37°C. Após esse período, a unidade foi assepticamente transferida para um tubo contendo a solução SD e submetida à agitação de acordo com a citada preparação das amostras para os experimentos *in vivo* e *in vitro*. Aliquotas das suspensões foram retiradas após as unidades serem agitadas nas duas últimas velocidades, quando, então, foram semeadas por disseminação em placas contendo ágar *mitis-salivarius* (Difco) com auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas em atmosfera anaeróbia a 37°C por 48 horas. Um organismo era considerado capaz de aderir à UD quando permanecia na mesma após ser submetido à 4ª velocidade de agitação.

Resultados e discussão

A etiologia da placa dental ou biofilme oral é multifatorial. Existe, no entanto, uma variedade de microrganismos, principalmente estreptococos, que tem sido consistentemente associada com a aderência inicial às superfícies dos dentes, e seu papel etiológico é indiscutível (DAVEY; OTOOLE, 2000). Análises de registros bacteriológicos durante os últimos anos mostram que os estreptococos respondem por mais de 80% da microbiota inicial das superfícies dos dentes (FRANDSEN; PEDRAZZOLI; KILIAN, 1991; PEARCE et al., 1995; SMITH et al., 1993; TAPPUNI; CHALLACOMBE, 1993). No Brasil, existem, no entanto, poucos dados disponíveis em relação às espécies de estreptococos que estão associadas com a formação inicial da placa dental, o que limita nossa capacidade para compreender este fenômeno, fundamentais para encontrar novas alternativas de controle e profilaxia da placa dental.

Microbiota estreptocócica associada com a formação inicial da placa dental

De um total de 86 culturas de estreptococos estudadas, 40,7% foram identificados como *S. sanguis*, 37,2% como *S. oralis*, 8,1% como *S. mutans*, 7,0% como *S. gordonii* e 7% como outros estreptococos (FIG. 1). Exceto pela ausência de *S. mitis*, os resultados acima correlacionam-se com aqueles relatados por Nyvad e Kilian (1987), os quais mostraram que *S. oralis* (previamente *S. mitior*), *S. sanguis* e *S. mitis* são predominantes entre as bactérias que colonizam as superfícies limpas dos dentes, iniciando, desse modo, a formação da placa dental. Alguns autores referem-se às dificuldades enfrentadas para caracterização bacteriológica apropriada do *S. mitis*. Outrossim, o fato de não encontrarmos essa espécie de estreptococo nos nossos experimentos pode ser atribuído à ausência desse microrganismo como colonizador primário, o que se justifica pela falta das enzimas neuraminidase e proteases específicas contra o sistema imune do hospedeiro, ou às próprias deficiências do sistema empregado para caracterização desse estreptococo.

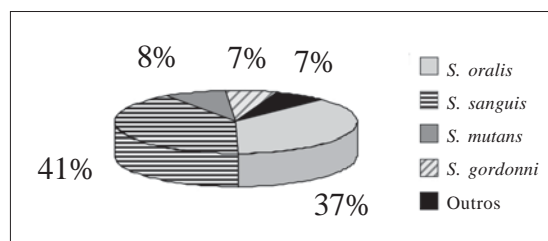


FIGURA 1- Microbiota estreptocócica associada com a formação inicial da placa dental

Nas culturas isoladas na 5ª velocidade de agitação, as quais representam a população bacteriana que está mais intimamente associada com a superfície do dente e, conseqüentemente, relacionada com a aderência inicial e colonização, observa-se que há diferenças entre as espécies de estreptococos presentes nos experimentos *in vivo* e *in vitro* (FIG. 2 e 3). No experimento *in vitro* (FIG. 2), registrou-se a presença de apenas *S. oralis* (66,7%) e *S. sanguis* (33,3%), enquanto, no experimento *in vivo* (FIG. 3), a

microbiota estreptocócica foi mais variada, sendo o *S. sanguis* (56,5%) predominante, seguido do *S. oralis* (21,7%), do *S. mutans* (15,2%) e de outros estreptococos (6,5%). A presença de *S. mutans* em percentual relativamente alto nos experimentos *in vivo* pode se justificar por se tratar de placas maduras obtidas de pacientes adultos e, de modo geral, com deficiente higiene oral.

Verifica-se, também, que há variações quanto às espécies de estreptococos predominantes no experimento *in vitro*, ao analisarmos os isolados obtidos na 4ª velocidade de agitação. Nessa velocidade de agitação, a microbiota estreptocócica constituiu-se de 54,6% de *S. sanguis* e 27,3% de *S. oralis*. Por sua vez, os percentuais de *S. oralis* aumentaram para 66,7% e aqueles obtidos para o *S. sanguis* diminuíram para 33,3% na 5ª velocidade de agitação (FIG. 2). Os resultados finais estão de acordo com aqueles relatados por Marshall (1992).

Ao serem examinados os dados dos experimentos efetuados *in vivo*, verificou-se que há uma certa discrepância em relação à microbiota estreptocócica encontrada na 4ª velocidade de agitação quando comparada com aquela detectada na 5ª velocidade de agitação (FIG. 3). Quantitativamente, os estreptococos que predominaram no experimento *in vivo* na última velocidade de agitação foram *S. sanguis* (56,5%) e *S. oralis* (21,7%), conforme a FIG. 3. Talvez a explicação para esses resultados esteja relacionada com o pH da placa, possivelmente mais ácido, graças à presença de *S. mutans*. Dessa forma, as cepas de *S. oralis* e *S. sanguis* isoladas podem não corresponder àquelas envolvidas com a aderência direta às superfícies dos dentes, mais suscetível a pH ácido (BOWDEN; HAMILTON, 1987). Nesse sentido, os estreptococos isolados da placa mais madura (*in vivo*) podem refletir subpopulações de *S. sanguis* que ainda suportam valores de pH mais ácido e viriam de camadas sobrepostas à camada iniciadora da placa dental. Por outro lado, os *S. oralis* e *S. sanguis*

oriundos do experimento *in vitro* provieram de placas com 48 horas de incubação, diferentemente dos estreptococos isolados da placa *in vivo*. Mesmo assim, novos experimentos devem ser efetuados, especialmente aqueles baseados em análise genética, com maior poder de discriminação, para permitir determinar e identificar os genótipos e a origem dos mesmos.

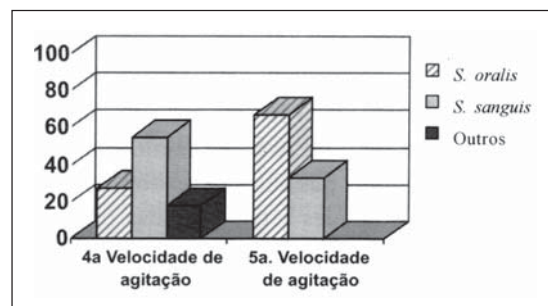


FIGURA 2 - Ocorrência percentual de estreptococos orais em modelo experimental

As contagens dos estreptococos que predominaram nos dois experimentos após a 5ª velocidade de agitação situaram-se em níveis de $1,0 \times 10^3$ UFC de *S. oralis*/UD no experimento *in vitro* e $1,3 \times 10^2$ UFC de *S. sanguis*/CUD no experimento *in vivo*.

Conforme análise dos resultados obtidos, percebe-se que existe uma progressão ordenada no crescimento da placa dentária com alterações nas proporções relativas das diferentes populações microbianas, graças, provavelmente, às diversas afinidades das diferentes bactérias às alterações dinâmicas da superfície da placa. Outros fatores da placa, como o pH, nutrientes disponíveis e potencial de oxidação e redução irão também contribuir para o fenômeno da sucessão bacteriana (DAVEY; OTOOLE, 2000). A propósito, os microrganismos placogênicos, isto é, aqueles que aderem inicialmente à PA, são inibidos quando o pH encontra-se baixo, enquanto as bactérias cariogênicas, tais como representantes do grupo *mutans* e lactobacilos, são estimulados a crescer (BOWDEN; HAMILTON, 1987).

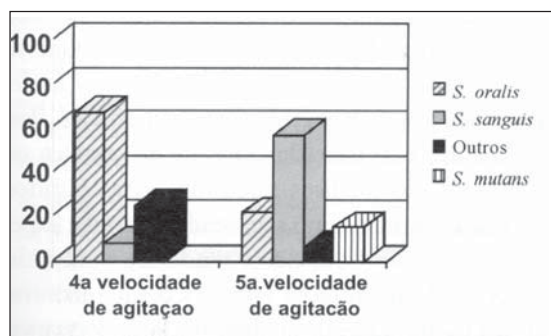


FIGURA 3 - Ocorrência percentual de estreptococos orais em placa dental formada naturalmente

Identificação e classificação dos estreptococos isolados

Estes resultados, registrados na FIG. 1, estão de acordo com aqueles relatados no **Manual** de Bergey. Entretanto, convém destacar que muitos estreptococos isolados das diversas amostras examinadas apresentaram muitas variações em seus caracteres bioquímicos e, por esse motivo, o novo esquema para identificação de estreptococos orais proposto por Tappuni e Challacombe (1993) precisa ser reavaliado. Uma parcela significativa dos estreptococos identificados como "outros" estavam relacionados ao *S. gordonii*, que se encontravam preferentemente nas amostras submetidas à 4ª velocidade de agitação, os quais também poderiam ser categorizados como colonizadores primários da superfície dos dentes, conforme descrevem Kolenbrander et al. (1998) e Kolenbrander e London (1992), juntamente com os *S. oralis* e *S. sanguis*.

Indução da adesão *in vitro* pelos estreptococos isolados

Das sete culturas testadas, apenas uma de *S. oralis* e uma de *S. sanguis* apresentaram aderência à superfície dentária (QUADRO 1). É importante salientar que estas culturas originaram-se do experimento de formação de placa *in vitro*. Outrossim, convém relatar que a espécie de *Streptococcus* similar ao *S. gordonii* e outra de *S. oralis* dos experimentos *in vitro* e uma de *S. mutans* do experimento *in vivo* não aderiram à superfície do dente. Desse modo, é possível que grande parte dos estreptococos isolados da placa *in vivo* e uns poucos da placa *in vitro* possa não corresponder aos colonizadores primários, visto que não apresenta-

ram propriedades de adesão *in vitro*. Mais uma vez, justificam-se novos experimentos para verificar se outras propriedades importantes de adesão ou virulência estão presentes nesses estreptococos e também para estudar fatores relativos ao microambiente do biofilme oral que porventura influencie esse fenômeno.

QUADRO 1

Indução experimental de adesão de estreptococos orais à superfície dentária

Cepas	Nº de cepas	Origem	Adesão
<i>S. oralis</i>	2	<i>in vitro</i>	+
		<i>in vivo</i>	-
<i>S. sanguis</i>	2	<i>in vitro</i>	+
		<i>in vivo</i>	-
<i>S. gordonii</i>	1	<i>in vitro</i>	-
<i>S. mutans</i>	1	<i>in vivo</i>	-
<i>Streptococcus spp.</i>	1	<i>in vivo</i>	-

Por outro lado, o sucesso do estabelecimento dos estreptococos orais não pode ser explicado somente por suas propriedades de aderência, mas também por sua capacidade de escapar dos mecanismos locais de defesa (COLE et al., 1999). A defesa imunológica específica é efetuada primariamente por imunoglobulina A secretória (S-IgA), cujas funções incluem a manutenção da integridade das superfícies orais, limitando a aderência microbiana às superfícies epitelial e dos dentes (COLE et al., 1999) através da neutralização de enzimas, toxinas e vírus, ou atuando sinergicamente com outros fatores antibacterianos, tais como lisozima, lactoferrina, peroxidases e mucinas salivares (MARCOTTE; LAVOIE, 1998, GIBBONS; van HOUTE, 1975; KILLIAN et al., 1996; KILLIAN; MESTECKY; RUSSEL, 1988), bem como impedindo a penetração de antígenos na mucosa oral. No entanto, apesar da presença do sistema imune secretor e altos níveis de S-IgA na saliva, a microbiota residente ainda persiste na cavidade oral (MARCOTTE; LAVOIE, 1998). Muitas bactérias da boca, incluindo-se *S. sanguis* e *S. oralis*, como também espécies de *Bacteroides* e *Capnocytophaga* produzem proteases, possivelmente como fatores de virulência, pois degradam as moléculas de IgA (REINHOLDT et al., 1990). Adicionalmente à liberação de proteases contra IgA, todos os estreptococos pre-

dominantes no início da formação da PD produzem glicosidases extracelulares capazes de degradar a fração polissacarídica das moléculas de IgA1, destruindo algumas das funções antibacterianas dessa imunoglobulina (REINHOLDT et al., 1990). Atividades de protease e glicosidase relatadas acima não foram observadas em nenhuma das cepas de *S. mutans*, *S. anginosus*, *S. salivarius* e *S. gordonii* estudadas por aqueles autores.

Conclusões

Apesar de os resultados de vários estudos indicarem que a placa formada sobre superfícies naturais e artificiais não difere, de modo significativo, em estrutura e em sua microbiota (MARCOTTE; LAVOIE, 1998), indicando, pelo menos, que alguns dos principais mecanismos envolvidos na formação da placa não estão relacionados à natureza da superfície sólida a ser colonizada, existem, entretanto, pequenas, mas significativas, diferenças na composição química da primeira camada de material orgânico formada sobre as superfícies artificiais quando comparadas àquela formada sobre as superfícies de dentes naturais. Esta informação foi de grande importância no momento do desenvolvimento do modelo de reprodução experimental da placa

(ALMEIDA et al., 1995, 1996), pois acreditamos que a película adquirida formada sobre as superfícies dentárias desempenhe um papel ativo na aderência seletiva de bactérias a estas superfícies. Possivelmente, esse fato, de certo modo, explica os resultados das análises microbiológicas obtidos nas placas estudadas no seu estado natural e experimentalmente. Além disso, tendo em vista a diversidade da microbiota estreptocócica encontrada nos biofilmes orais analisados, são necessários estudos mais profundos em relação a potencial de adesão, estruturas envolvidas, metabolismo e mecanismos de interação existentes entre elas e, em particular, às bactérias cariogênicas, para compreender melhor esse fenômeno, no sentido de desenvolver novas estratégias para o controle e a profilaxia da cárie e de doenças periodontais.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Dr. Milton de Uzeda, Professor Titular do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela cooperação durante a fase inicial do trabalho, a Dra. Rogéria Comastri de Castro Almeida, Professora Titular da Universidade Federal da Bahia, pelo estímulo e apoio a todas as etapas do trabalho experimental, e ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Abstract

*The identification and quantification of early streptococci that colonize the tooth surfaces in the complex biofilm of dental plaque, as well as the clear understanding of the functional relationship between them and other members are required before we can fully appreciate and possibly manage the processes that this initial community performs. Bacterial plaques were aseptically removed from teeth of healthy persons and experimentally inoculated onto sterilized dental units previously covered with sterile oral fluid. The inoculated dental unity (DU) was incubated at 37°C in a wet chamber. After the plaque formation, the DU was put in a solution (Detachment Plaque Solution -DPS) with 0.1% peptone water, 0.1% of Tween 80, and 0.5% calcinated sand (p/v). Then DU was submitted, successive and progressively, to five speed agitation levels. Aliquots of these solutions were collected and diluted in sterile phosphate buffer saline solution (PBS) immediately after each agitation.. In the period between each agitation the DU was softly washed in sterile PBS then inoculated in a new DPS solution. "In vivo" experiments were also performed using recently extracted teeth by using the same technique. Aliquots of dilutions were plated on the surface of appropriated media and spread by a sterile bent-glass rod. Inoculated plates were incubated at 37°C in anaerobic atmosphere. Plates were examined for 48 hours when the total and differential colonies were counted. Each colonial type was subcultured and submitted to the standard bacterial identification. A total of 86 Streptococcus cultures were studied. From these, 40.7 % were identified as *S. sanguis*, 37.2 % as *S. oralis*, 8.1% as *S. mutans*, 7.0% as *S. gordonii*, and 7.0% as other Streptococci. Analysis of the cultures isolated from the last speed agitation level showed that in the *in vitro* experiments only *S. oralis* (66.7%) and *S. sanguis* (33.3%) were present. In the "in vivo" experiments *S. sanguis* (56.5%) predominated, followed by *S. oralis* (21.7%), *S. mutans* (15.2%) and other streptococci (6.5%). The experiments performed to verify the ability of adhesion of seven cultures of isolated streptococci showed that only one strain of *S. oralis* and one strain of *S. sanguis* attached to the tooth surfaces.*

Key words

Streptococci, dental plaque, adherence, oral biofilm

Referências

- ALMEIDA, P. F. et al. Estudo da aderência de alguns estreptococos orais nas superfícies dentárias. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ODONTOLOGIA, 28., 1996, Salvador. Livro de resumos. p. 44.
- ALMEIDA, P. F. et al. Um método simples para estudo da microbiota iniciadora da formação da placa dental. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA, 18., 1995, Santos. Livro de resumos. p. 105.
- BOWDEN, G. H. W.; HAMILTON, I. R. Environmental pH as a factor in the competition between strains of the oral streptococci *S. mutans*, *S. sanguis*, and *S. "mitior"* growing in continuous culture. *Can. J. Microbiol.*, n. 33, p. 824-827, 1987.
- BOWDEN, G. H. W.; ELLWOOD, D. C.; HAMILTON, I. R. Microbial ecology of the oral cavity. *Adv. Microb. Ecol.*, n. 3, p. 135-217, 1979.
- CISAR, J. O. et al. Lectin recognition of host-like saccharide motifs in streptococcus cell wall polysaccharides. *Glycobiology*, n. 5, p. 655-662, 1995.
- COLE, M. F. et al. Humoral immunity to commensal oral bacteria in human infants: salivary secretory immunoglobulin A antibodies reactive with *Streptococcus mitis* biovar 1, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, and *Enterococcus faecalis* during the first two years of life. *Infect. Immun.*, n. 67, p. 1878-1886, 1999.
- DAVEY, M.; OTOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Ver.*, n. 64, p. 847-867, 2000.
- FRANSEN, E. V. G.; PEDRAZZOLI, V.; KILIAN, M. Ecology of *viridans streptococci* in the oral cavity and pharynx. *Oral Microbiol. Immunol.*, n. 6, p. 129-133, 1991.
- GIBBONS, R. J.; VAN HOUTE, J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.*, n. 29, p. 19-44, 1975.
- HARDIE, J. M. *Genus Streptococcus*. In: SNEATH et al. (Ed.) *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2. p. 1054-1063.
- HILLMAN, J. D.; SOCRANSKY, S. S. The theory and application of bacterial interference to oral diseases. In: MYERS, H. M. (Ed.) *New biotechnology in oral research*. Basel: Karger, 1990. p. 1-17.
- JENKINSON, H. F. Adherence and accumulation of oral streptococci. *Trends Microbiol.*, n. 2, p. 209-212, 1994.
- KENNY, E. B.; ASH, M. M. Oxidation reduction potential of developing plaque, periodontal plaque, periodontal pockets and gingival sulci. *J. Periodontol.*, n. 40, p. 630-633, 1969.
- KILIAN, M.; MESTECKY, J.; RUSSEL, M. W. Defense mechanisms involving Fc-dependent function of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol. Rev.*, n. 252, p. 296-303, 1988.
- KILIAN, M. et al. Biological significance of IgA1 protease in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *APMIS*, n. 104, p. 321-338, 1996.
- KOLENBRANDER, P. E.; LONDON, J. Ecological significance of coaggregation among oral bacteria. *Advan. Microb. Ecol.*, n. 12, p. 183-217, 1992.
- KOLENBRANDER, P. E. et al. The adhesion-associated *sca* operon in *Streptococcus gordonii* encodes an inducible high-affinity ABC transporter for Mn21 uptake. *J. Bacteriol.*, n. 180, p. 290-295, 1998.
- KOLENBRANDER, P. E. et al. Spatial organization on oral bacteria in biofilms. *Methods Enzymol.*, n. 310, p. 322-332, 1999.
- LANG, N. P. et al. Placa e cálculos dentais. In: LINDHE, J. (Ed.) *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. Tradução de Edson Jorge Lima Moreira. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 66-89.
- LINDHE, J. Placa dental e cálculo dental. In: *Tratado de periodontia clínica*. Tradução de Milton de Uzeda. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. p. 58-87.
- LISTGARTEN, M. A.; MAYO, H.; AMSTERDAM, M. Ultrastructure of the attachment device between coccid and filamentous microorganisms in "corn cob" formations in dental plaque. *Arch. Oral Biol.*, n. 8, p. 651-656, 1973.
- MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, n. 62, p. 71-109, 1998.
- MARSHALL, K. C. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. *American Society of Microbiology News*, n. 58, p. 202-207, 1992.
- NYVAD, B.; KILLIAN, M. Comparison of initial streptococcal microflora on dental enamel. *Caries Res.*, n. 24, p. 267-272, 1990.
- NYVAD, B.; KILIAN, M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. *Scand. J. Dent. Res.*, n. 95, p. 369-380, 1987.
- PEARCE, C. et al. Identification of pioneer *viridans streptococci* in the oral cavity of human neonates. *J. Med. Microbiol.*, n. 42, p. 67-72, 1995.
- REINHOLDT, J. et al. Molecular aspects on immunoglobulin A1 degradation by oral streptococci. *Infect. Immun.*, n. 5, p. 1186-1194, 1990.
- ROSE, R. K. The role of calcium in oral streptococcal aggregation and the implication for biofilm formation and retention. *Biochem. Biophys. Acta*, n. 1475, p. 76-82, 2000.
- SMITH, D. J. et al. Oral streptococcal colonization of infants. *Oral Microbiol. Immunol.*, n. 8, p. 1-4, 1993.
- TAPPUNI, A. R.; S. J. CHALLACOMBE. Distribution and isolation frequency of eight streptococcal species in saliva from prenatate and dentate children and adults. *J. Dent. Res.*, n. 72, p. 31-36, 1993.