

DICLER DE SANT'ANNA VITOR BARBIERI

**ANÁLISE DA ADERÊNCIA “IN VITRO” DE *Streptococcus mutans*  
e *Candida albicans* NA SUPERFÍCIE DENTÁRIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia – Área de Concentração: Microbiologia - Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vânia Aparecida Vicente

Co-Orientador: Prof. Dr. Fabian Calixto Fraiz

CURITIBA  
2005

DICLER DE SANT'ANNA VITOR BARBIERI

**ANÁLISE DA ADERÊNCIA “IN VITRO” DE *Streptococcus mutans*  
e *Candida albicans* NA SUPERFÍCIE DENTÁRIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia – Área de Concentração: Microbiologia - Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vânia Aparecida Vicente

Co-Orientador: Prof. Dr. Fabian Calixto Fraiz

CURITIBA  
2005

***“A pior coisa que pode acontecer na vida de uma pessoa, não é quando seu projeto não dá certo, seu plano de ação não funciona ou quando a viagem termina no lugar errado. O pior é não começar. Esse é o maior naufrágio”.***

**Amyr Klink**

## **DEDICATÓRIA**

**A DEUS, pelas graças, pela proteção, pelos amigos, por cada amanhecer...**

**A minha família, pelo carinho e pelas orações.**

**A minha mãe, minha estrela lá no céu.**

**Ao meu pai, sempre presente, tentando ajudar em todos os momentos.**

**Aos meus queridos irmãos, Cláudia e Eduardo, pela compreensão e incentivo constantes.**

**Ao meu cunhado Alex, pela amizade e ajuda nas traduções.**

**Aos meus sobrinhos, Beatriz, Pedro e Isadora, sorrisos que alegam nossas vidas.**

**Ao meu marido, Nilson, pela compreensão, paciência, ajuda incondicional em tudo que precisei, principalmente com as crianças. Eu te amo.**

**Aos meus queridos filhos, Gabriel e Lucas, pelo envolvimento e pela torcida para que tudo desse certo desde a prova de seleção, obrigada pelas palavras de incentivo pelos abraços que tanto me fortaleceram. Amo vocês.**

**A minha caçulinha Laura, nossa princesinha, pelos desenhos maravilhosos que você fez para mim, que refletem todo amor do seu coraçãozinho. Você me inspira. A mamãe te ama.**

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

**Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol,**

**Sua força e determinação, mesmo quando todas as condições se mostram adversas são admiráveis. A paixão com que você se dedica à pesquisa é sem dúvida um exemplo.**

**Obrigada pela oportunidade de fazer parte da primeira turma de Mestrado do Programa de Pós Graduação do Departamento de Patologia Básica.**

**Profa. Dra. Vânia Aparecida Vicente,**

**Há alguns anos atrás você aceitou o desafio de me orientar, mesmo sabendo que eu era uma principiante em pesquisa. Você depositou sua confiança em mim, me mostrou que os caminhos são traçados ao caminhar, me ensinou a buscar, me apontou os erros e aprendi com eles. Aprendi que os desafios são muitos e agradeço pelo crescimento como pessoa e como pesquisadora nesta nossa caminhada.**

**Esta dissertação é a expressão de uma pequena parte do aprendizado, pois a transformação foi muito maior.**

**Agradeço a você por tudo e desejo que Deus esteja sempre ao seu lado para te proteger, te fortalecer e te iluminar.**

**Prof. Dr. Fabian Calixto Fraiz,**

**Admirável profissional e pessoa. Obrigada pela amizade, pelo incentivo constante e pelas conversas que sempre geraram questionamentos e boas idéias. Compartilhar da sua experiência foi um grande privilégio. Que seus caminhos sejam sempre de muito sucesso!**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho. Aos que me ouviram, aos que me apoiaram, aos que me ensinaram, aos que me incentivaram, meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Danilo Antonio Duarte, pela amizade, palavras de incentivo e por fazer parte fundamental da minha formação profissional com suas atitudes e ensinamentos tão preciosos.

Ao Prof. Dr. Renato Cordeiro Gugisch, pelos conselhos, compreensão e colaboração sempre que precisei.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski, pelo carinho e pelas sugestões que muito enriqueceram este trabalho.

A Profa. Dra. Dorly de Freitas Buchi, pelas sugestões propostas e palavras de incentivo.

A amiga Prof<sup>a</sup>. Ivana Neiva Froede pelo companheirismo, presença constante durante a elaboração dos protocolos de coleta e bioquímica. Desejo à você muito sucesso.

A Prof<sup>a</sup>. Rosângela Lameira Pinheiro, Emília, Lili e toda equipe do Setor de Micologia do Hospital de Clínicas da UFPR, que me acolheram e me ensinaram. Vocês são pessoas lindas.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Yanê Carvalho pela amizade, dicas, sugestões, grande apoio no laboratório e durante a correção.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilma Hiroko Higuti, pelas palavras de incentivo e pelo apoio. Muito obrigada.

A amiga Prof. Sheila de Carvalho Stroppa, pelas palavras de incentivo e otimismo, você é uma pessoa muito especial.

Ao Prof. Dr. José Vítor Nogara B. de Menezes pelas sugestões e incentivo.

A Prof<sup>a</sup>. Laura Coggo do Setor de Bacteriologia do Hospital de Clínicas da UFPR, pela inestimável ajuda durante a realização das provas bioquímicas.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, pela colaboração e disponibilidade.

Ao NAP/MEPA – ESALQ/USP – Piracicaba – S.P pelo apoio durante o preparo das amostras para M.E.V.

A Prof<sup>a</sup>. Lucélia Donatti, Departamento de Biologia Celular – UFPR, pela disponibilidade, responsabilidade e amizade. Agradeço a grande ajuda na geração das imagens na M.E.V.

A Prof<sup>a</sup>. Cláudia Trindade da Universidade de São Paulo, pela amizade, apoio e colaboração. Que os seus caminhos sejam sempre abençoados.

Aos professores do Programa de Mestrado, pelos valiosos ensinamentos.

Aos colegas do curso de mestrado que sempre me incentivaram, em especial Keite, Jucélia, Cássima, Elisângela, Mônica e Elaine pelo apoio e amizade.

Aos estagiários do Laboratório de Microbiologia, Ibrahin, Eduardo, Fernanda e Samarina pela colaboração constante.

Aos Professores Doutores Aguinaldo José do Nascimento e Juarez Gabardo, pelas valiosas sugestões nas análises estatísticas e ao Prof. Dr. Osmir José Lavoranti pela realização da análise estatística final deste trabalho.

A CAPES, CNPq por tornar possível este trabalho.

Aos funcionários e professores do Departamento de Patologia Básica pelo apoio e disponibilidade.

As bibliotecárias e funcionários da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas – UFPR, pela colaboração e atenção.

Aos pacientes que fizeram parte deste estudo.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVO</b> .....	4
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
3.1 BIOFILME .....	5
3.2 SALIVA E PAPEL IMUNOLÓGICO DO HOSPEDEIRO .....	6
3.3 CÁRIE.....	8
3.4 <i>Streptococcus mutans</i> .....	9
3.4.1 Fatores de Virulência do <i>Streptococcus mutans</i> .....	12
3.4.2 Colonização por <i>Streptococcus mutans</i> . .....	15
3.5 <i>Candida albicans</i> .....	16
3.5.1 Fatores de Virulência da <i>Candida albicans</i> .....	20
3.5.2 Colonização por <i>C. albicans</i> .....	21
3.6 ADERÊNCIA “IN VITRO” .....	23
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
4.1 MEIOS DE CULTURA .....	27
4.1.1 Caldo BHI.....	27
4.1.2 Ágar Batata Glicose –BDA.....	27
4.1.3 Caldo Sabouraud .....	27
4.1.4 Ágar Sangue. ....	27
4.1.5 Ágar Mitis Salivarius Sacarosado com Bacitracina e Telurito de Potássio (MSBS) (GOLD, 1973) .....	28
4.1.6 Caldo Gibbons e Nygaard ( GIBBONS e NYGAARD, 1968) .....	28
4.2 SOLUÇÕES E REAGENTES.....	29
4.2.1 Solução Salina .....	29
4.2.2 Água Peptonada .....	29
4.2.3 Fixador de Karnovisk .....	29



4.2.4 PBS (Tampão Fosfato Salino) .....	29
4.3 ESTERILIZAÇÃO .....	30
4.4 LINHAGENS UTILIZADAS .....	30
4.5 CASUÍSTICA .....	30
4.6 EXAME CLÍNICO .....	30
4.7 COLETAS SALIVARES .....	31
4.8 ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ESTIMATIVA DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> NA SALIVA .....	31
4.9 ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ESTIMATIVA DE <i>S. mutans</i> NA SALIVA .....	34
4.9.1 Provas Bioquímicas para Identificação de <i>S. mutans</i> .....	35
4.10 SISTEMA DE ADERÊNCIA “IN VITRO” (YOSHIYASU, 2001) .....	36
4.10.1 Preparo dos Corpos de Prova .....	36
4.10.2 Preparo dos Inóculos .....	37
4.10.3 Montagem do Sistema de Aderência “In Vitro” .....	37
4.11 PREPARO DOS DENTES PARA A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	38
4.12 ANÁLISE QUANTITATIVA DA ADERÊNCIA .....	39
4.12.1 Linhagens Utilizadas .....	39
4.12.2 Preparo dos Inóculos .....	39
4.12.3 Montagem do Sistema de Aderência .....	39
4.12.4 Avaliação Quantitativa da Aderência .....	40
4.12.5 Contagem Estimada das UFC/cm <sup>2</sup> .....	40
4.12.6 Análise Estatística .....	40
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
5.1 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS .....	41
5.2 ANÁLISE QUALITATIVA DA ADERÊNCIA “IN VITRO” .....	45
5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DA ADERÊNCIA “IN VITRO” .....	56
5.3.1 Avaliação da Aderência de <i>S. mutans</i> .....	56
5.3.2 Avaliação da Aderência de <i>C. albicans</i> .....	58
5.3.3 Avaliação da Aderência do <i>S. mutans</i> Associado a <i>C. albicans</i> ...	60
5.3.4 Avaliação da Aderência de <i>C. albicans</i> Associada ao <i>S. mutans</i> .	61
5.3.5 Avaliação dos Limites de Aderência de Todos os Grupos .....	62
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	DESENVOLVIMENTO CARACTERÍSTICO DO GÊNERO <i>Candida</i> .....	32
FIGURA 2 -	PRESENÇA DE TUBO GERMINATIVO – AUMENTO 400X.....	33
FIGURA 3 -	PADRÃO DE DESENVOLVIMENTO DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS.....	35
FIGURA 4 -	MONTAGEM DO SISTEMA DE ADERÊNCIA.....	38
FIGURA 5 -	COMPORTAMENTO DOS SISTEMAS DE ADERÊNCIA DURANTE INCUBAÇÃO .....	47
FIGURA 6 -	FORMAÇÃO DE BIOFILME APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO.....	48
FIGURA 7 -	ELETROMICROGRAFIA DO PADRÃO DE ADERÊNCIA DE <i>S. mutans</i> ISOLADAMENTE .....	50
FIGURA 8 -	ELETROMICROGRAFIA DO PADRÃO DE ADERÊNCIA DE <i>C. albicans</i> ISOLADAMENTE .....	52
FIGURA 9 -	ELETROMICROGRAFIA DO PADRÃO DE ADERÊNCIA DE <i>C. albicans</i> ASSOCIADA A <i>S. mutans</i> .....	54
FIGURA 10 -	COMPORTAMENTO DE ADERÊNCIA DE <i>S. mutans</i> EM UFC/cm <sup>2</sup> .....	57
FIGURA 11 -	COMPORTAMENTO DE ADERÊNCIA DE <i>C. albicans</i> EM UFC/cm <sup>2</sup> .....	59
FIGURA 12 -	COMPORTAMENTO DE ADERÊNCIA DE <i>S. mutans</i> ASSOCIADO EM UFC/cm <sup>2</sup> .....	60
FIGURA 13 -	COMPORTAMENTO DE ADERÊNCIA DE <i>C. albicans</i> ASSOCIADA EM UFC/cm <sup>2</sup> .....	62
FIGURA 14 -	COMPORTAMENTO MÉDIO DE ADERÊNCIA EM UFC/cm <sup>2</sup> DOS GRUPOS AVALIADOS.....	63

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DIFERENCIAÇÃO DOS GRUPOS DE <i>Streptococcus viridans</i> (KONEMAN et al., 2001) .....	12
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE ESPÉCIES DE <i>Candida</i> DE IMPORTÂNCIA MÉDICA ( KONEMAN et al., 2001).....	19
TABELA 3 - CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA UTILIZADA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE <i>S. mutans</i> (JORGE, 1998).....	35
TABELA 4 - PADRÃO DE ISOLAMENTO DAS AMOSTRAS SALIVARES.....	43
TABELA 5 - NOMENCLATURA DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NOS TESTES DE ADERÊNCIA "IN VITRO".....	46
TABELA A1 - AVALIAÇÕES QUALITATIVAS DOS TESTES DE ADERÊNCIA .....	77
TABELA A2 - CONTAGEM ESTIMADA DA ADERÊNCIA DE <i>S. mutans</i> EM UFC/cm <sup>2</sup> .....	79
TABELA A3 - CONTAGEM ESTIMADA DA ADERÊNCIA DE <i>C. albicans</i> EM UFC/cm <sup>2</sup> .....	79
TABELA A4 - CONTAGEM ESTIMADA DA ADERÊNCIA DE <i>S. mutans</i> ASSOCIADO A <i>C. albicans</i> EM UFC/cm <sup>2</sup> .....	80
TABELA A5 - CONTAGEM ESTIMADA DA ADERÊNCIA DE <i>C. albicans</i> ASSOCIADA A <i>S. mutans</i> EM UFC/cm <sup>2</sup> .....	80
TABELA A6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA ADERÊNCIA DOS MICRORGANISMOS EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO .....	82
TABELA A7 - PARÂMETROS UTILIZADOS PARA TRATAMENTO ESTATÍSTICO .....	82
TABELA A8 - CONTRASTES ORTOGONAIS DO TESTE F (TEMPOS DE 2 A 72 HORAS)	82
TABELA A9 - CONTRASTES ORTOGONAIS DO TESTE F - LIMITE DE CONFIANÇA DE 95% (p=0,05) .....	83

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar qualitativamente e quantitativamente, a capacidade de aderência de *S. mutans* e *C. albicans* isoladamente e associados. Foi realizado ensaio de aderência "in vitro" na superfície dentária, cuja análise foi feita por Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.). Para este ensaio de aderência, foram utilizados sistemas com dentes humanos em meio Gibbons e Nygaard, acrescidos dos inóculos *C. albicans* e *S. mutans* isoladamente e associados, incubados por 21 dias. Os isolados eram provenientes de amostras salivares de crianças coinfetadas e linhagens de referência ATCC dos dois microrganismos. A análise por meio de M.E.V. mostrou menor aderência de *C. albicans* do que *S. mutans* na superfície dentária quando inoculados isoladamente. Quando inoculados juntos no mesmo sistema, *C. albicans* apresentou aumento de aderência. Também houve favorecimento na aderência de *S. mutans* quando em associação com *C. albicans*, mostrando aumento de colonização pela utilização da superfície celular da levedura como suporte de aderência. Um segundo experimento foi desenvolvido buscando avaliar quantitativamente essa aderência, para tanto foi utilizado um sistema de aderência "in vitro" com uso de cortes de acrílico como corpos de prova, e como inóculos os isolados com comportamentos contrastantes do primeiro ensaio, sendo que os resultados confirmaram que durante a associação de *C. albicans* e *S. mutans* em meio rico em sacarose, houve potencialização da aderência de ambos, porém *S. mutans* demonstrou ser mais beneficiado nesta associação. Os dados obtidos pelos dois ensaios de aderência "in vitro" permitem sugerir que embora no meio bucal as interações microbianas sejam muito mais complexas, a presença dos dois microrganismos associados pode favorecer a aderência de ambos, e o conseqüente aumento de colonização por *S. mutans* pode ser considerado mais um fator relevante no aumento de risco à cárie.

## ABSTRACT

The aim of this study was the qualitative and quantitative investigation of the adherence capacity of *S. mutans* and *C. albicans* separately and associated. It was performed "in vitro" adherence assay in the dental surface whose analysis was done through Scanning Electron Microscopy (S.E.M.). For this adherence assay, were used systems with human teeth in Gibbons and Nygaard medium, added of the *C. albicans* and *S. mutans* inoculums separately and associated, incubated during 21 days. The isolated were obtained from salivary samples from children coinfectad and reference lineages ATCC of the two microorganisms. The analysis by S.E.M. showed smaller adherence of *C. albicans* than *S. mutans* in the dental surface when inoculated separately. When associated, *C. albicans* presented increased adherence. The *S. mutans* adherence, when associated to *C. albicans*, also was favored, showing increased colonization by the utilization of the cellular surface of the yeast as adherence support. A second experiment was developed to confirm this adherence quantitatively, using acrylic samples as "in vitro" adherence system and the isolated with contrasting behaviors of the first assay as inoculums. The results confirmed that when *C. albicans* and *S. mutans* were associated in sucrose rich medium, there was improved adherence from both, however *S. mutans* demonstrated to be the most benefited in this association. The results obtained by the two "in vitro" adherence assays allow to suggest that in despite the oral microbial interactions are much more complex, the presence of the two microorganisms associated can privilege the adherence from both, and the consequent increased colonization of *S. mutans* could be considered another important factor to the risk of caries.

## 1 INTRODUÇÃO

A prevenção de doenças bucais, principalmente cárie e doença periodontal já é uma realidade cada vez mais concreta à população com acesso aos serviços de atenção odontológica, portanto, quanto maior o número de informações a respeito da microbiota bucal, história familiar, dieta e hábitos do indivíduo, pode-se atuar na prevenção dessas doenças, detectando precocemente situações que acarretam a quebra do tenuous equilíbrio do ecossistema bucal.

A microbiota bucal tem importante papel tanto na saúde bucal como no desenvolvimento de doenças decorrentes da alteração desse ecossistema. Ela contribui para o desenvolvimento do sistema imune, permitindo a colonização equilibrada de grande variedade de microrganismos, e pode constituir reservatório de microrganismos potencialmente invasivos aos tecidos do hospedeiro. Na complexidade desse ecossistema deve-se levar em consideração a idade do hospedeiro, habilidade e potencial imunológicos, aparecimento de novos nichos com o desenvolvimento estomatognático e dental, mudanças dietéticas, qualidade e frequência da higiene bucal, uso de substâncias antibacterianas e exposição ao flúor (MARCOTTE e LAVOIE, 1998; BOWDEN e HAMILTON, 1979; JORGE, 1998).

Todos esses fatores associados poderão interferir nos mecanismos de colonização, aderência e coagregação microbianas (MARCOTTE e LAVOIE, 1998; KOLENBRANDER, 2000).

Para que microrganismos tornem-se parte da microbiota indígena, há necessidade de nichos adequados e mecanismos que permitam sua permanência nesses locais. Mecanismos de retenção como aderência através de glicocálix, pili ou fímbrias, adesinas, camadas de hidratação, formação de polímeros bacterianos extracelulares e salivares e a coagregação de microrganismos, potencializam a aderência de determinada espécie microbiana a constituintes de outros microrganismos, da mesma espécie ou não. Estes mecanismos de aderência são ainda facilitados pelas fissuras e fósulas dos dentes, lesões de cárie, partículas alimentares, sulco gengival e bolsas periodontais (JORGE, 1998; HANNULA, 2000).

Uma das doenças bucais que reflete falha no equilíbrio da microbiota bucal é a cárie, que em sua progressão desencadeia a destruição de tecidos mineralizados dos dentes. A cárie dental é considerada uma doença infecciosa, transmissível e multifatorial. Entre os fatores principais apontados para que a cárie se estabeleça estão o hospedeiro com dentes susceptíveis, colonizados por microrganismos potencialmente cariogênicos, dieta com alto consumo de carboidratos e higiene bucal deficiente (LOESCHE, 1986; LINDQUIST, 1991; NAPIMOGA, 2004).

A bactéria *Streptococcus mutans* é considerada agente etiológico da cárie, capaz de se aderir nas superfícies dentais e iniciar a formação da placa bacteriana cariogênica. Devido ao seu sistema metabólico, gera um nicho acidogênico que extrapola a capacidade tampão salivar, desencadeando alterações na camada mineral da superfície dentária, provocando a desmineralização progressiva e iniciando o processo carioso (KREULEN et al., 1997; JORGE, 1998; GRÖNROOS, 2000).

Sabe-se que em pacientes com alta atividade de cárie, a concentração de *S. mutans* na saliva é freqüentemente elevada. Tal concentração varia de hospedeiro para hospedeiro, sendo as condições endógenas do mesmo responsáveis por estes níveis (CARLSSON et al., 1985; CASTRO e MOCHIDOME, 2000). Vários fatores relacionados à ecologia bucal são atribuídos a condições que favorecem o estabelecimento e multiplicação de *S. mutans* na cavidade bucal. As características genéticas do hospedeiro associadas a microbiota bucal são as mais relevantes.

A levedura *Candida albicans* por sua vez, possui morfologia extremamente versátil podendo estar presente no meio bucal sem causar qualquer dano, porém quando em associação a fatores predisponentes é capaz de invadir tecidos causando candidíase, que é uma infecção oportunista.

De acordo com a literatura, *C. albicans* tem sido isolada na placa bacteriana, porém seu papel na coagregação ao *S. mutans* durante os mecanismos de aderência microbiana na superfície dentária ainda está sendo motivo de investigação. A presença de *C. albicans* em lesões cariosas já estabelecidas tem sido demonstrada, além da capacidade de invasão de tecidos e materiais artificiais que permanecem no meio bucal como, por exemplo, o acrílico



utilizado em muitos tipos de próteses (NIKAWA et al., 2003; AKDENIZ et al., 2002, PIRES et al., 2001; SEN et al., 1997; CANNON et al., 1995).

A hipótese da inter-relação entre *S. mutans* e *C. albicans*, baseia-se em seus mecanismos de virulência e características bioquímicas, associados a fatores endógenos e exógenos que propiciem ao hospedeiro um ambiente bucal que favoreça a atuação dos dois microrganismos (AKDENIZ et. al., 2002).

A presença de *C. albicans* no meio bucal está associada à placa dental e estomatites, porém, há ainda necessidade de estudos no que se refere ao desenvolvimento da placa dental “in vivo”. Muitos estudos “in vitro” têm sugerido que *C. albicans* é um organismo colonizador da placa, contudo poucas investigações têm se concentrado no estudo da sucessão de microrganismos aderindo como colonizadores primários ou secundários. Há concordância que a hidrofobicidade da superfície celular é um importante fator na aderência inicial de microrganismos em superfícies inertes, porém, como essas superfícies são modificadas pela ação da saliva ainda não está completamente esclarecido. Pesquisas adicionais sobre a parede celular de *C. albicans* em suas diferentes apresentações morfológicas também poderão determinar adesinas específicas e como esses complexos moleculares se relacionam com a saliva. Esses esclarecimentos dependem de um grande entendimento do desenvolvimento da placa dental “in vivo” e de pesquisas adicionais “in vitro” que colaborem com essas investigações (RADFORD, et al., 1999).

Dentro deste contexto, a análise do comportamento de aderência “in vitro” de *S. mutans* e *C. albicans* poderá ser útil no sentido de trazer subsídios para auxiliar no entendimento do comportamento desses dois microrganismos no meio bucal.

## 2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi analisar qualitativamente e quantitativamente a capacidade de aderência “in vitro”, de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na superfície dentária, isoladamente e associados, a partir de amostras salivares coinfectadas com os dois microrganismos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Do ponto de vista ecológico, a cavidade bucal é um sistema de crescimento aberto. Isto significa que nutrientes e microrganismos são repetidamente introduzidos e removidos desse sistema. Somente se estabelecem microrganismos que possuem capacidade de aderência às superfícies da cavidade bucal ou que, de alguma outra maneira fiquem retidos. Algumas bactérias podem conseguir um refúgio nos sulcos, fissuras ou espaços interproximais. Outros microrganismos utilizam mecanismos específicos de aderência para vencer as forças de remoção das superfícies bucais (JORGE, 1998; CASTRO e MOCHIDOME, 2000).

#### 3.1 BIOFILME

Segundo LEITE et al. (2001), o termo biofilme é empregado para designar comunidades de microrganismos (bactérias e/ou fungos) aderidas sobre uma superfície e sob a ação contínua de um fluxo.

A formação do biofilme dental é etapa inicial no desenvolvimento da doença cárie assim como infecções periodontais, e ocorre em duas fases distintas. Durante a primeira fase, bactérias que possuem carga negativa podem alcançar por energia cinética uma superfície natural que também possui carga negativa. Na segunda fase, o biofilme acumula bactérias por coagregação com a mesma espécie ou com outras espécies utilizando mecanismos e estruturas como glicocálice, adesinas, pili, além da produção de matriz polissacarídica extracelular (JORGE, 1998; KOLENBRANDER, 2000).

O ciclo de desenvolvimento do biofilme pode ser resumido em quatro fases: a iniciação, a maturação, a manutenção e a dissolução. A plasticidade fenotípica permite que bactérias se adaptem às alterações impostas pelo meio ambiente ao qual estão submetidas. A transição entre um estado e outro é feita de maneira controlada e é altamente complexa sob o ponto de vista fisiológico, bioquímico e molecular (O' TOOLE et al., 2000).

Os biofilmes podem ser formados por uma única ou por diferentes espécies de microrganismos. No seu processo de formação, uma comunidade microbiana multiespécie, com um patógeno predominante, interage com o hospedeiro, dividindo espaço e recursos disponíveis com outros organismos oportunistas.

O biofilme garante a vida da colônia em ambientes não estáveis, com fluxo constante de líquidos. Pode-se atribuir ao biofilme uma série de vantagens para a colônia, como melhor comunicação entre células, em função da solução de continuidade entre elas, facilitando as atividades bioquímicas, melhor proliferação, acesso a nichos e recursos que não poderiam ser utilizados por células isoladas e a defesa coletiva contra fatores antagônicos (LEITE et al., 2001).

A formação do biofilme na superfície dental é fenômeno complexo, e possivelmente a chave para o esclarecimento das patologias bucais de origem bacteriana. O entendimento preciso da formação e virulência desse biofilme em função do tempo, fatores imunológicos, fatores microbianos, entre outros têm sido pesquisados por muitos autores, e vêm sendo gradativamente esclarecidos (MONTANARO et al., 2004).

### 3.2 SALIVA E PAPEL IMUNOLÓGICO DO HOSPEDEIRO

Entre os fatores relacionados ao hospedeiro, é importante ressaltar os vários mecanismos antimicrobianos inespecíficos presentes na saliva e os anticorpos imunoglobulinas A (IgA), que funcionam como primeira linha de defesa contra diferentes agentes infecciosos. A imunidade à cárie pode estar relacionada a anticorpos IgA específicos secretados na saliva, embora dados existentes na literatura sejam muito contraditórios (MARCOTTE e LAVOIE, 1998).

A saliva é uma mistura complexa de vários componentes, formada principalmente por secreções das glândulas salivares, mas também contém fluido gengival, células epiteliais descamadas, microrganismos, leucócitos, resíduos alimentares, sangue entre outros componentes, sendo essencial para manutenção da saúde bucal. Reveste a mucosa bucal e protege contra irritação, forma reservatório de íons para a remineralização dentária, apresenta função de tamponamento de pH, ação antimicrobiana, participa da formação da película

adquirida e na digestão enzimática da amilase e participa ainda das sensações gustativas por sua ação solvente. Os componentes antimicrobianos da saliva incluem imunoglobulinas, lisozimas, lactoferrinas, peroxidases, amilases e proteínas aniônicas. Além disso, seus componentes orgânicos, especialmente as glicoproteínas, funcionam como nutrientes para os microrganismos bucais. As proteínas salivares podem ser degradadas por proteases produzidas, por exemplo, por *S. mutans* e *S. sanguis*. O conteúdo bacteriano de saliva é estimado em  $10^9$  bactérias por ml. A saliva ajuda a controlar a invasão da cavidade bucal por microrganismos. Um fluxo salivar aumentado pode diminuir a concentração microbiana e a falta da mesma resulta em aumento do número de bactérias na microbiota bucal (TENOVUO, 1998).

Macrófagos e polimorfonucleares são lançados na cavidade bucal e funcionam como a principal linha de defesa contra a invasão e multiplicação de *C. albicans*. Outros agentes antimicrobianos como a IgA estão presentes e também possuem função protetora na multiplicação e aderência de *C. albicans* (UETA et al., 2000).

A imunoglobulina A (IgA) constitui anticorpo predominante nas secreções, incluindo a saliva. A IgA é considerada a primeira linha de defesa do hospedeiro frente aos patógenos que colonizam ou invadem superfícies banhadas pelas secreções. A principal função da IgA parece ser limitar a aderência, tal como a penetração de antígenos estranhos no interior da mucosa (AALTONEN et al., 1990). Além disso, bactérias indígenas têm sido encontradas revestidas pela IgA. (MARCOTTE e LAVOIE, 1998; KOLENBRANDER, 2000).

Para GREGORY et al. (1990), a resistência à cárie pode ser devido à atividade neutralizante de anticorpos, capaz de inibir o crescimento de estreptococos, aderência, produção de ácidos e atividade das enzimas glicosiltransferase e fosfoglicosiltransferase.

Nos últimos anos, acumularam-se evidências de que anticorpos, passivamente transferidos da mãe para a criança, via placenta ou pela amamentação, possam estimular primariamente os linfócitos contribuindo para o desenvolvimento da imunidade ativa no neonato. Este fenômeno deve, portanto, influenciar a resposta de anticorpos para *S. mutans* nos primeiros anos de vida (HANNULA, 2000; MARCOTTE e LAVOIE, 1998).

Estudos “in vitro” têm mostrado que anticorpos específicos podem inibir a aderência de *S. mutans* à hidroxiapatita recoberta por saliva e interferir com a habilidade desta bactéria colonizar a cavidade bucal. As enzimas glicosiltransferases (GTFs) produzidas por *S. mutans* podem induzir respostas imunes que inibem a atividade catalítica dessas enzimas. As pesquisas na produção de vacinas para cáries partem desses princípios (LI et al., 2003).

### 3.3 CÁRIE

Os estreptococos do grupo mutans têm sido encontrados em praticamente todos os indivíduos desde alta, baixa ou muito baixa prevalência de cárie (CARLSSON et al., 1985), porém a simples detecção destes microrganismos na saliva ou placa dental não justifica o desenvolvimento de cárie, devendo-se levar em consideração, a concepção da natureza multifatorial da cárie como doença, a qual esta sujeita às próprias condições sócio-econômicas, culturais e ambientais de uma população (MATTOS-GRANER et al., 2001; BRATTHALL, 1992), entre esses fatores destaca-se a dieta com alto teor de sacarose e a qualidade e frequência de higiene bucal como fundamentais para a ocorrência da doença cárie.

A cárie dentária é uma das doenças infecciosas, transmissíveis mais prevalentes em humanos e uma das mais dispendiosas com relação ao tratamento sintomático restaurador (LOESCHE, 1986). Além disso, o tratamento das lesões de cárie é ineficaz para o controle e eliminação da doença.

A lesão de cárie é manifestação de um processo patológico que ocorre em consequência de uma interação entre bactérias presentes na cavidade bucal, superfícies dentais e constituintes da dieta, especialmente a sacarose.

Com relação a microbiota bucal, a colonização precoce dos dentes por *S. mutans*, é fator de risco conhecido e que predispõe a cárie na dentição decídua (MATTOS-GRANER et al., 2000).

Dentre as várias formas de manifestação de lesões cariosas há que se destacar a “cárie de mamadeira”, que acomete crianças de aproximadamente um a três anos de idade que recebem aleitamento natural ou artificial noturno e não realizam higiene bucal adequada. Essas lesões são de progressão rápida,

bastante agressivas, geralmente têm início na porção cervical dos dentes incisivos superiores decíduos na forma de manchas brancas e opacas indicando uma descalcificação do esmalte dentário pela constante presença da placa bacteriana. Nesta fase, ainda há possibilidade de impedir o agravamento das lesões se for instalado controle rigoroso do padrão dietético e hábitos de higiene bucal, além de terapia com flúor, essas medidas envolvem todo o núcleo familiar num processo de mudança de comportamento. (FRAIZ e WALTER, 2001; BÖNECKER et al., 1997; FRAIZ, 1993).

O consumo excessivo de carboidratos propicia meio adequado à proliferação desses microrganismos produtores de ácidos que levam à desmineralização do esmalte. Assim, a progressão da doença cárie depende de hospedeiro suscetível, microbiota patogênica e dieta rica em carboidratos, interagindo em condições críticas num determinado período de tempo (YAZAKI et. al., 1999; PETTI e HAUSEN, 2000).

#### 3.4 *Streptococcus mutans*

Os estreptococos do grupo viridans incluem várias espécies de estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos e não hemolíticos, a maioria dos quais são parte da microbiota normal do trato respiratório superior, genital e orofaringe. Os estreptococos viridans podem ser divididos em grupo mutans (os isolados de origem humana *S. mutans* e *S. sobrinus*, mais algumas espécies de origem animal como *S. cricetus*, *S. rattus* e *S. macacae*), grupo salivarius (*S. salivarius* e *S. vestibularis*), grupo mitis (*S. mitis* e *S. oralis*) e grupo sanguis (*S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. parasanguis* e *S. crista*) (FRANDSEN et al., 1991).

Os estreptococos do grupo mutans foram isolados no início do século XX, em crianças inglesas, e descritos como estreptococos “mutantes”, visto que apresentavam morfologia celular mais achatada que outros estreptococos (MATTOS-GRANER, 1999).

Os estreptococos do grupo mutans que habitam a cavidade bucal emergiram como importantes agentes patogênicos, predominantemente associados com o início e a patogenia da cárie dental.

*S. mutans*, *S. sobrinus* e outros membros de estreptococos bucais do grupo mutans são capazes de produzir enzimas denominadas glicosiltransferases, que hidrolizam a sacarose da dieta em glicose e frutose, e unem os resíduos de glicose entre si por meio de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 e  $\alpha$ -1,4 para formar glicanos insolúveis. Esses glicanos conferem aos microrganismos a capacidade de aderir às superfícies lisas dos dentes e formar a matriz do biofilme dental. A aderência específica de *S. mutans* e de outros microrganismos aos glicanos aderentes e insolúveis e a subsequente formação de ácidos, promovem a desmineralização do esmalte dentário e o início das lesões de cárie ( LOESCHE, 1986; GRÖNROOS, 2000).

Outros estreptococos bucais, incluindo *S. sanguis*, *S. salivarius* e possivelmente *S. gordonii*, também podem sintetizar estes polissacarídeos, mas apenas os estreptococos do grupo mutans apresentam aumento de colonização induzido pela sacarose.

Além disso, *S. mutans* também parecem produzir maior quantidade de ácidos a partir de carboidratos, do que outras bactérias bucais, porque são capazes de fermentar grande variedade de açúcares e são mais resistentes aos ácidos do que outros estreptococos bucais. Esses microrganismos também sintetizam polissacarídeos intracelulares que podem ser metabolizados para produzir ácidos na ausência de carboidratos fermentáveis exógenos, (GRÖNROOS, 2000).

Os estreptococos do grupo mutans foram originalmente descritos como uma única espécie: *S. mutans*, dividida em oito subgrupos designados de *a* a *h* em função da especificidade sorológica dos antígenos de carboidratos da parede celular. Mais tarde, esses vários sorotipos foram classificados em categorias de espécies independentes: *S. mutans* (que inclui os sorotipos *c*, *e* e *f*) e *S. sobrinus* (sorotipos *d* e *g*) são os membros do grupo mutans que predominam no homem (BENTLEY et al., 1991).

As células de *S. mutans* são Gram positivas, têm morfologia ovalada, medem cerca de 0,5 a 0,75  $\mu$ m de diâmetro, agrupam-se aos pares ou em cadeias, requerem meios nutricionalmente ricos para seu crescimento, são anaeróbios facultativos e sua temperatura ótima de crescimento é de 37°C. Em meio de cultura Ágar Mitis Salivarius, formam colônias pequenas, fortemente



aderidas ao meio de cultura, e com bordas irregulares. Com adição de sacarose ao ágar, muitas linhagens de *S. mutans* produzem colônias de cerca de 1 mm de diâmetro. Quando cultivados em ágar sangue em microaerofilia por 48 horas, as colônias de *S. mutans* apresentam-se brancas ou cinzas, circulares ou irregulares com 0,5 a 1,0 mm de diâmetro, tendendo aderir na superfície do ágar. O meio de cultura mais freqüentemente utilizado para o isolamento primário de *S. mutans* é o Ágar Mitis Salivarius com adição de sacarose, bacitracina e telurito de potássio (GOLD et al., 1973). A identificação de *S. mutans* é baseada na sua morfologia colonial, seletividade ao meio de cultura, coloração de Gram, morfologia à microscopia ótica e características de crescimento específicas quanto ao padrão enzimático e assimilação de açúcares (GRÖNROOS, 2000; KONEMAN et al., 2001).

Também podem ser utilizados outros métodos de identificação como anticorpos monoclonais, análise de DNA através da detecção de genes específicos como o gene B glicosiltransferase (*gtfB*), gene frutossiltransferase (*fff*), gene dextranase (*dexA*).

A Tabela 1 apresenta a diferenciação bioquímica dos grupos de estreptococos viridans.

TABELA 1 - DIFERENCIAÇÃO DOS GRUPOS DE *Streptococcus viridans* (KONEMAN et al., 2001)

Grupo Viridans	Hidrólise Arginina	Hidrólise Esculina	Reação VP	Fermentação Manitol	Fermentação Sorbitol	Produção Urease
<b>Grupo mutans</b>	-	+	+	+	+	-
<i>S. mutans</i>						
<i>S. sobrinus</i>						
<i>S. cricetus</i>						
<i>S. rattus</i>						
<b>Grupo sanguis</b>	+	+	-	-	-	-
<i>S. sanguis</i>						
<i>S. parasanguis</i>						
<i>S. gordonii</i>						
<i>S. crista</i>						
<b>Grupo mitis</b>	-	-	-	-	-	-
<i>S. mitis</i>						
<i>S. oralis</i>						
<b>Grupo salivarius</b>	-	+	+	-	-	v
<i>S. salivarius</i>						
<i>S. vestibularis</i>						

+: reação positiva; -: reação negativa; v: reação variável.

### 3.4.1 Fatores de Virulência do *Streptococcus mutans*

O termo virulência é descrito como a capacidade de um microrganismo causar doenças em um hospedeiro. A relação entre hospedeiro e microrganismo é dinâmica, dependente de suas características individuais e do inter-relacionamento com fatores externos. A virulência de uma bactéria consiste em propriedades que promovem sua entrada, colonização e crescimento no hospedeiro. Dentre os estreptococos do grupo mutans, *Streptococcus mutans* é considerado de maior relevância devido aos seus fatores de virulência, sendo descritos como agente etiológico da cárie dental (HAMADA e SLADE, 1980; LOESCHE, 1986).

GIBBONS (1984), relatou que o potencial cariogênico de *S. mutans* é principalmente dependente das suas altas propriedades acidogênicas e da

habilidade de se acumular nos dentes, principalmente devido à síntese de glucanos extracelulares a partir da sacarose.

A produção de ácidos e a capacidade de metabolização de substratos em meio ácido, foram os primeiros fatores de virulência atribuídos a microrganismos específicos relacionados à etiologia da cárie (LOESCHE, 1986; KOHLER et al., 1995).

Alguns estudos demonstraram que existem diferenças na capacidade de produção de ácidos entre as diferentes espécies de estreptococos do grupo mutans. DE SOET et al. (1991), observaram que *S. sobrinus* eram mais acidogênicos do que *S. mutans* em animais gnotobióticos. KÖHLER et al. (1995), detectaram diferenças na produção de ácidos entre linhagens de *S. mutans* isoladas de humanos. Embora tenham observado grandes variações na acidogenicidade entre linhagens de *S. mutans* isoladas de diferentes indivíduos, os autores não foram capazes de associar o potencial acidogênico com o número de lesões de cárie presentes nos indivíduos colonizados por estes microrganismos.

VAN HOUTE et al. (1996), avaliaram o pH final do meio de cultura rico em sacarose, após cultivo de amostras de placa bacteriana de superfícies dentárias com diferentes condições clínicas (lesões de cárie de raiz, superfícies radiculares hígidas, lesões de manchas brancas em esmalte, lesões coronárias de cárie ativa e superfícies coronárias hígidas) e observaram que quando *S. mutans* estava presente em maior concentração na placa, foram detectados os menores valores de pH, em torno de 4,2, coincidindo com as amostras de placa das superfícies dentárias com lesões, sugerindo que a cariogenicidade da placa é dependente do aumento na proporção de organismos acidogênicos e acidúricos.

Além da tolerância aos ácidos e produção de ácidos, os *S. mutans* ainda possuem como mecanismos de virulência, a capacidade de sobrevivência no biofilme dental devido à alta capacidade de adaptação ao ambiente, presença de adesinas na superfície celular, produção de glicosiltransferases, mutacina e polissacarídeos extracelulares. Em adição a esses fatores, outras propriedades podem influenciar a virulência de *S. mutans*, entre elas a atividade proteolítica, capaz de degradar colágeno dos substratos (HOMER et al., 1990, HARRINGTON e RUSSEL, 1994; JACKSON et al. 1997).

Enzimas associadas à célula do microrganismo utilizam sacarose como substrato, separando-a em glicose e frutose, e por fermentação clássica produzem energia e grande quantidade de ácido láctico. Algumas moléculas de glicose provenientes da sacarose são convertidas em polissacarídeo intracelular de alto peso molecular (amilopectina ou glicogênio), este processo proporciona armazenamento de material para o metabolismo energético quando nenhum substrato exógeno for encontrado. Além disso, os *S. mutans* podem produzir hidrolases glicosídicas que extraem hidratos de carbono da saliva para utilização como fonte de energia (GRÖNROOS, 2000).

MATTOS-GRANER et al. (2000), avaliaram algumas características fenotípicas de virulência de *S. mutans* isolados de crianças com e sem atividade de cárie e observaram uma relação positiva entre a produção de glucanos insolúveis e a capacidade de adesão ao vidro, sugerindo que linhagens de crianças com alta atividade de cárie podem colonizar mais eficientemente, induzindo mais facilmente a cárie dental.

Segundo ALALUUSUA et al. (1996), a maior diversidade genética de estreptococos do grupo mutans observada em crianças com cárie de mamadeira, deve-se às condições propícias do ambiente para o estabelecimento de múltiplos genótipos. Entretanto, contrário a esta posição, KREULEN et al. (1997), verificaram que crianças com lesões de cárie rampante apresentavam apenas um clone de *S. mutans* enquanto os respectivos irmãos, sem lesões de cárie, apresentavam de 2 a 5 clones, sugerindo que clones específicos de *S. mutans* são selecionados em cavidades orais com atividade de cárie.

Avaliando a diversidade clonal de isolados de *S. mutans* em indivíduos livres de cárie e cárie-ativos, NAPIMOGA (2004) concluiu em seu estudo que indivíduos cárie ativos albergam um maior número de genótipos de *S. mutans* com alta capacidade de sintetizar glucanos insolúveis, quando comparado com genótipos isolados de indivíduos livres de cárie.

### 3.4.2 Colonização por *Streptococcus mutans*

Em geral, a aquisição de microrganismos pelo corpo humano ocorre por contato direto entre um hospedeiro e outro, ou através de objetos inanimados, como chupetas e brinquedos. A saliva é a principal via de transmissão de *S. mutans* (KÖHLER e BRATTHALL, 1979), e a mãe é considerada a mais importante fonte de infecção para as crianças (LI e CAUFIELD, 1995; KLEIN et al., 2004), embora outros estudos tenham sugerido haver outras formas de aquisição (MATTOS-GRANER et al., 2001).

Os processos iniciais de colonização da cavidade bucal incluem a introdução de diversas populações microbianas. Bactérias do gênero *Streptococcus* do grupo viridans (*S. mitis*, *S. oralis* e *S. salivarius*) podem ser considerados alguns dos pioneiros neste processo, porém alguns organismos variam de acordo com as condições endógenas do hospedeiro (LI e CAULFIELD, 1995).

A levedura *C. albicans*, por exemplo, em alguns portadores, assim como *S. mitis*, *oralis* e *salivarius* colonizam diferentes superfícies epiteliais da cavidade bucal. O surgimento de novos nichos favorece a colonização por novos microrganismos (CASTRO e MOCHIDOME, 2000; DUCHIN e VAN HOUTE, 1978).

A colonização inicial por *S. mutans* na superfície dental envolve interações entre a superfície da célula bacteriana e receptores da película adquirida, este mecanismo é considerado sacarose-independente. Em seguida, com a entrada da sacarose, a célula bacteriana ativa as enzimas glicosiltransferases que sintetizam glucanos extracelulares, intensificando as ligações e o acúmulo de bactérias resultando numa massa microbiana tenaz, a placa bacteriana.

Os mecanismos precisos pelos quais os *S. mutans* são capazes de colonizar e se acumular nas superfícies dentárias ainda vêm sendo esclarecidos.

A colonização dos dentes, possivelmente ocorre em duas fases distintas, aparentemente independentes. A fase primária ou inicial de colonização é dependente da interação específica de proteínas da película adquirida do esmalte com moléculas de superfície da célula bacteriana denominadas adesinas. A segunda fase de colonização é denominada fase de acúmulo e propicia o aumento do número de células bacterianas na placa dental, importante para a

produção de ácidos, que favorece os processos de desmineralização dental. O acúmulo de *S. mutans* nas superfícies dentárias envolve diferentes processos de interação, coaderência e coagregação com outros microrganismos bucais (KOLENBRANDER e LONDON, 1993).

CAULFIELD et al. (1993) em estudo longitudinal de 46 crianças desde o nascimento até cinco anos de idade, detectaram *S. mutans* em 21% das crianças aos 19 meses de idade e em 62% das crianças aos 31 meses de idade. Entre as crianças não infectadas até os 31 meses de idade todas se mantiveram livres de *S. mutans* até aos 5 anos de idade. Estes autores sugeriram que o período crítico para a implantação de *S. mutans* na cavidade bucal corresponderia ao intervalo entre 19 e 31 meses de idade, o qual foi denominado de “janela de infectividade”, que coincide com a erupção dos molares decíduos.

A detecção de *S. mutans* na saliva de indivíduos dentados é bastante elevada. KOGA – ITO et al. (2003), analisando uma população de crianças respiradoras bucais encontraram uma prevalência de 75%. NAPIMOGA (2004), analisando a clonalidade de *S. mutans* em pares mãe/filho encontrou prevalência de 80% nas amostras salivares das crianças e 100% nas amostras salivares das mães. AZEVEDO et al., (1998), avaliando as espécies de estreptococos do grupo mutans isolados de amostras salivares de pares mãe/filho detectou 94% de *S. mutans* nas crianças e 100% nas mães.

Os estreptococos do grupo mutans não são, entretanto, considerados bons colonizadores primários dos dentes uma vez que há outros estreptococos bucais como *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. gordonii* e *S. oralis* que apresentam adesinas de maior afinidade à película adquirida (KOLENBRANDER e LONDON, 1993).

### 3.5 *Candida albicans*

As leveduras mais comuns na cavidade bucal são as do gênero *Candida*. São encontradas principalmente no dorso da língua, onde as papilas filiformes e reentrâncias, como o forame cego e fissura mediana servem de sítios que fornecem proteção e favorecem o desenvolvimento de infecção (ARENDORF e WALKER, 1980). Além desses sítios essas leveduras também têm sido isoladas da placa bacteriana dental, lesões de cárie, microbiota subgengival, saliva e em

algumas situações em canais radiculares (CANNON e CHAFFIN, 1999; SEN et al., 1997).

*C. albicans* pode estar presente no homem como sapróbio ou causando infecção, principalmente quando sua presença se associa a fatores ligados ao hospedeiro como, por exemplo, baixa imunidade, desordens endócrinas, lesões em tecidos moles, higiene bucal deficiente, prolongada terapia antibiótica, fatores nutricionais, baixo fluxo salivar, uso de próteses. Esses fatores seriam desencadeantes de infecção, porém, a severidade desta, além de estar relacionada a fatores do hospedeiro também se deve às propriedades inerentes ao próprio microrganismo (MOREIRA et al., 2001; SEN et al., 1997; FLAITZ e HICKS, 1999).

*C. albicans* é freqüentemente denominada fungo dimórfico, embora alguns autores discordem deste termo, pois dependendo das condições ambientais como pH, temperatura e reservas nutricionais altera seu fenótipo, passando de blastoconídeos para crescimento micelial, devido à formação de pseudohifas, porém, também pode se desenvolver como hifas verdadeiras e clamidoconídeos, sendo que todas as formas de crescimento apresentam interconversão, exceto clamidoconídeos (CANNON e CHAFFIN, 1999; JORGE, 1998; SEN et al., 1997). É caracterizada primariamente pela morfologia colonial em meio de cultura Ágar Sabouraud, formação de tubo germinativo, assimilação de carbono, e capacidade fermentativa. Seu crescimento é favorecido em temperaturas variando de 20° C a 38° C. O pH ácido favorece sua proliferação sendo que a faixa ideal de pH para seu crescimento varia de 2,5 até 7,5. As células leveduriformes são de formato esférico, medindo 3 a 5µm de diâmetro.

Segundo KONEMAN et al. (2001), o primeiro passo para a identificação de um isolado leveduriforme desconhecido é a realização da prova do tubo germinativo. O tubo germinativo é definido como uma extensão filamentosa de uma célula de levedura cuja largura é cerca da metade e o comprimento ao redor de 3 a 4 vezes o diâmetro da célula mãe. O verdadeiro tubo germinativo de *C. albicans* não apresenta constrição no ponto de origem. As pseudo-hifas precoces de *C. tropicalis* podem ser similares, porém mostram uma área de constrição característica adjacente à célula mãe. O novo material celular que compõe o tubo germinativo representa hifa verdadeira que, por definição, não possui ponto de constrição.

O tubo germinativo com estreitamento representa a formação de pseudo-hifa derivada de um processo de brotamento do blastoconídeo. Podem ser observados “tubos germinativos” com ou sem constrição na prova para *C. albicans*; entretanto, se a preparação parece conter apenas tubos estreitados, deve ser considerada a possibilidade de presença de *C. tropicalis* ou outra espécie de *Candida*. Quando a diferenciação for clinicamente importante, devem ser realizados estudos de assimilação de carboidratos além de outros testes confirmatórios de identificação. Se não forem observados tubos germinativos, a amostra pode ser considerada como “*Candida* não *albicans*”, entretanto, cerca de 5% das linhagens de *C. albicans* são negativas para o tubo germinativo, portanto para a identificação conclusiva devem ser realizadas provas adicionais, como, por exemplo, o uso de diversos sistemas comerciais mecanizados para a identificação de leveduras, entre eles o sistema VITEK (YBC) que quando utilizado adequadamente fornece até 93% de precisão na identificação (PINCUS et al., 1999; KELLOGG et al., 1998).

As espécies de *Candida* diferentes de *C. albicans* formam parte da microbiota normal de superfícies cutâneas e mucosas, apenas em raras ocasiões foram consideradas como agentes de doenças. Várias causas têm sido propostas para explicar a súbita emergência de tantas espécies novas de leveduras como agentes infecciosos, entre os quais são citados o uso de antibióticos de amplo espectro, agentes antineoplásicos, cateterismo endovenoso, neutropenia e imunossupressão (KONEMAN et al., 2001; MOREIRA et al., 2001; SEN et al., 1997).

*C. parapsilosis* tem sido considerada como importante patógeno associado a infecções sistêmicas em Unidades de Terapia Intensiva Neonatais podendo estar associado à transmissão nosocomial (SILVA et al., 2001; KUHN, et al., 2002; KUHN, et al., 2004; BENJAMIN JR et al., 2000).

A Tabela 2 mostra a grade simplificada e o algoritmo para identificação de espécies de *Candida*. A prova com glicose não aparece na Tabela 2 porque todas as espécies de *Candida* assimilam glicose, portanto, essa característica não tem valor de diferenciação e não discrimina entre qualquer par de espécies. As reações de fermentação de carboidratos também foram omitidas, essas provas são raramente efetuadas na maioria dos laboratórios, devido à variação de



reatividade causada por carboidratos contaminantes adsorvidos na parede celular (KONEMAN et al., 2001).

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE ESPÉCIES DE *Candida* DE IMPORTÂNCIA MÉDICA (KONEMAN et al., 2001)

	Assimilação de											
	Maltose	Sacarose	Triose	Galactose	Celobiose	Xilose	Rafnose	Lactose	Ducitol	Melibiose	Urease	NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. catenulata</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>C. kefyr</i>	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>C. lambica</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. lipolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. lusitaniae</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. rugosa</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. zeulanooides</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota-se que a grade não permite diferenciar entre *C. lusitaniae* e *C. tropicalis*; para realizar separação bioquímica é necessário incluir o teste de assimilação de arabinose. *C. albicans* e *C. parapsilosis* também não podem ser diferenciadas bioquimicamente nessa grade; entretanto isso não representa um problema, mesmo com linhagens de *C. albicans* negativas para tubo germinativo, porque a morfologia em ágar fubá é nitidamente diferente (KONEMAN et al., 2001).

### 3.5.1 Fatores de Virulência da *Candida albicans*

A aderência é considerada o primeiro estágio de colonização de *C. albicans*, com subsequente disseminação da levedura quando ocorre desequilíbrio nos mecanismos de defesa do hospedeiro. A aderência envolve macromoléculas de superfície celular microbiana que interagem com macromoléculas de determinado substrato. Há evidências que *C. albicans* pode produzir mais de uma estrutura de aderência, ou que mais que uma dessas estruturas possam estar envolvidas nesse processo, como proteínas, lipídeos e a manoproteína como principal adesina. Os receptores de vários tecidos aos quais *C. albicans* se liga não têm sido bem caracterizados, embora muitas investigações têm sugerido que podem ser fibrolectinas, certos fosfolipídeos, L-fucose, manose, lamininas e colágeno (PIRES et al., 2001).

CANNON et al. (1995) atribuem às mudanças na superfície da parede celular de *C. albicans*, sua grande plasticidade de aderência, pois essas mudanças fenotípicas podem expor superfícies protéicas mais hidrofóbicas alterando assim as propriedades de aderência. Esses mesmos autores relatam estudos onde proteínas presentes na superfície da célula quando em forma de hifas não foram encontradas na superfície celular quando na forma de levedura, podendo ser um dos motivos do aumento da capacidade de aderência da forma filamentosa em algumas situações. Ainda com relação à parede celular de *C. albicans*, CANNON e CHAFFIN (1999) consideram que as mudanças na superfície desta propiciam maiores interações entre a levedura e as proteínas do hospedeiro favorecendo a aderência. Além desses fatores, fenômenos físicos como forças eletrostáticas contribuem para aderência de *C. albicans* a diferentes substratos (NIKAWA et al., 2003).

RADFORD et al., (1999) apontam a hidrofobicidade das espécies de *Candida* como um fator significativo que afeta sua adesão a superfícies inertes.

De acordo com CANNON et al. (1995), a secreção de enzimas hidrolíticas freqüentemente contribui na patogênese de doenças microbianas. *C. albicans* secreta várias enzimas incluindo fosfolipase, lipase, fosfomonoesterase, hexosaminidase, e pelo menos três proteinases. Dentre essas enzimas, as proteinases têm sido as mais estudadas e sugere-se que seja um fator de virulência (ROSS et al., 1990).

Muitas pesquisas ainda caminham para a elucidação do fenômeno de aderência de *C. albicans* a diferentes superfícies.

### 3.5.2 Colonização por *C. albicans*

A colonização da cavidade bucal por *C. albicans* pode ser definida como aquisição e manutenção de uma população estável de células as quais não dão origem a doença. Portanto, a colonização depende de diversos fatores como o número de células que entram na cavidade bucal, sua aderência e crescimento, sua penetração nos tecidos e remoção dessas células da cavidade bucal, por diferentes mecanismos.

Na cavidade bucal de recém-nascidos a aquisição de *C. albicans* pode ocorrer no momento do nascimento, principalmente em crianças nascidas através de parto normal em mães portadoras da levedura na sua microbiota urogenital, ou ainda pelas mãos, pele, secreções bucais, durante os cuidados e manuseio da criança por indivíduos colonizados. ARENDORF e WALKER (1980), encontraram uma variação em indivíduos colonizados com *C. albicans* sem candidíase de 300 a 500 UFC/ml de saliva, enquanto REGO et al. (2003) relataram em seu trabalho uma concentração de 125 a 246 UFC/ml de saliva, em crianças de 4 e 10 anos de idade sem candidíase.

*C. albicans*, coloniza diferentes superfícies epiteliais da cavidade bucal e o surgimento de novos nichos favorece a colonização por novos microrganismos (CASTRO e MOCHIDOME, 2000). Conforme o processo de colonização continua, a diversidade e complexidade aumentam, chegando a microbiota bucal a possuir mais de 300 espécies microbianas. A sucessão se estabiliza quando não há nichos adicionais para novas populações, porém esse ecossistema não é estável.

A presença de *C. albicans* na cavidade bucal de crianças tem sido relatada com frequência. Certas condições como o uso excessivo de antibióticos, podem desequilibrar a microbiota bucal e promover o crescimento de *C. albicans*, principalmente em indivíduos com sistema imune comprometido.

A candidíase é a mais comum manifestação clínica de infecção por *C. albicans* na cavidade bucal. Essa infecção se não tratada adequadamente pode

invadir outros tecidos e disseminar-se tornando-se muito grave (AKDENIZ et al., 2002; NIKAWA et al., 2001; UETA et al., 2000).

É difícil estimar o número de portadores de *C. albicans* numa população, esta taxa irá depender da idade, condições gerais de saúde, além de fatores relacionados à metodologia do isolamento. CANNON e CHAFFIN (1999) relatam variações de 1,9% a 62,3% em indivíduos saudáveis e de 6,0% a 69% em indivíduos hospitalizados sem candidíase. Segundo ARENDORF e WALKER (1980), a prevalência de portadores varia de 3% a 77% , e consideram a metodologia de “imprint” a que mais favorece a detecção de portadores.

Vários trabalhos vêm investigando a relação entre a colonização por *C. albicans* e a presença de lesões de cárie, porém a efetiva relação entre a presença desta levedura no meio bucal, e sua interferência no risco ou atividade de cárie ainda não foi demonstrada.

REGO et al., (2003) analisaram o efeito da adequação do meio bucal sobre contagens de leveduras do gênero *Candida* em crianças cárie ativas e portadoras, de 4 a 10 anos, e concluíram que este procedimento clínico demonstrou ser eficiente na diminuição das contagens da levedura. MOREIRA et al., 2001 avaliaram as diferentes espécies de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de 239 estudantes de diferentes classes sócio-econômicas, porém os autores consideraram que pelo fato do grupo analisado ser de baixo risco à cárie, não houve relação positiva entre a presença de lesões de cárie e colonização por *C. albicans*.

MOALIC et al. (2001), investigando a colonização por *C. albicans* na cavidade bucal de 353 estudantes franceses associaram a atividade de cárie à presença da levedura.

JORGE et al. (1997) avaliaram a colonização por *C. albicans* na cavidade bucal de 493 pacientes com relação a vários fatores predisponentes, porém neste trabalho os autores não consideraram a atividade de cárie como grupo analisado.

### 3.6 ADERÊNCIA “IN VITRO”

Na tentativa de elucidar os fenômenos de interações microbianas, coagregação, aderência e metabolismo dos diferentes microrganismos bucais, muitos modelos “in vitro” têm sido desenvolvidos, embora nesse tipo de estudo existam vantagens e desvantagens. Dependendo do tipo de análise a ser realizada, os fatores inerentes a microbiota bucal necessitam ser minimizados para a análise mais detalhada de cada fenômeno.

Esses modelos incluem como corpos de prova, cortes dentais, fragmentos de dentina, vidro, entre outros. Os modelos utilizados para ensaio de aderência são freqüentemente analisados através de Microscopia Eletrônica de Varredura, Cintilografia, ELISA com utilização de anticorpo específico para a bactéria em estudo e contagem de Unidades Formadoras de Colônia (GAINES et al., 2003).

EICK et al. (2004), em estudo de aderência “in vitro” analisou a capacidade de aderência de *S. mutans* a diferentes materiais restauradores, com análise do experimento por meio de M.E.V. e contagem de Unidades Formadoras de Colônias (U. F. C.).

ALDSWORTH e MACFARLANE (2001) desenvolveram um sistema de aderência “in vitro” em membranas de ultrafiltração para a investigação de formação de placa bacteriana formada por bactérias bucais no estudo de desenvolvimento de lesões de cárie de raiz.

SAMARANAYAKE et al. (1986) estudaram as características de crescimento e produção de ácidos de isolados de *C. albicans* e *C. glabrata* e observaram que na presença de glicose houve grande produção de piruvatos e acetatos que foram responsáveis pela redução de pH. Estes autores sugeriram que em termos clínicos, pacientes com dietas ricas em glicose e portadores de candidíase atrófica crônica possuem tendência de agravamento da patologia.

Especificamente com relação à interação de aderência de *C. albicans* e *S. mutans*, alguns estudos vêm sendo propostos e alguns resultados têm sido sugeridos, embora ainda necessitem de dados mais consistentes que confirmem esses achados.

BRANTING et al. (1989) estudando estomatites bucais em portadores de próteses em acrílico, avaliaram a adesão de *C. albicans* e *S. mutans* em

superfícies acrílicas incubando os microrganismos em meios contendo glicose e sacarose e concluíram que na presença de sacarose *S. mutans* aderiu fortemente à superfície acrílica, enquanto que *C. albicans* em presença tanto de glicose como sacarose apresentou-se fracamente ligada à superfície acrílica. Uma firme adesão de *C. albicans* à superfície acrílica foi observada quando a levedura foi incubada simultaneamente com *S. mutans* na presença de sacarose. Além disso, foi também verificada coagregação entre *S. mutans* e *C. albicans* na presença de sacarose, o que não ocorreu na presença de glicose, seus resultados foram analisados por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura e por marcadores cintilográficos das células aderidas. Neste trabalho, os autores concluíram que a presença de *S. mutans* em meio rico em sacarose pode favorecer a aderência de *C. albicans* pela presença de polímeros extracelulares produzidos pela bactéria.

BEIGHTON et al. (1995) relacionaram a alta prevalência de *Candida ssp.* (58,5%) em 82 lesões de cárie de raiz. Sabe-se que a desmineralização da superfície radicular ocorre em pH na faixa entre 4,3 a 5,0, portanto, tem sido freqüente a utilização de desafio de pH nos modelos experimentais "in vitro" de cáries de raiz sugerindo a colonização eficiente por *C. albicans* em regiões dentais recobertas pelo fluido gengival.

SEN et al. (1997) verificou o padrão de crescimento de *C. albicans* na dentina radicular. Quinze cortes de raízes dentárias foram infectadas com *C. albicans* e incubadas por diferentes períodos. Essas raízes foram fixadas em glutaraldeído e avaliadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura. Foram observados blastoconídeos e hifas em todas as amostras analisadas. A forma de hifas filamentosas foi observada nas amostras incubadas por 5 dias e a maior parte das hifas e blastoconídeos apresentaram penetração nos túbulos dentinários. Os autores concluíram que devido a esta afinidade invasiva às estruturas dentinárias, *C. albicans* pode ser considerada um microrganismo dentinofílico.

NIKAWA et al. (1998), pesquisando o potencial cariogênico da placa dentária contendo *C. albicans* investigou o efeito da saliva e soro na colonização por *C. albicans* e *S. mutans* em cristais de hidroxiapatita. A colonização de três isolados de *C. albicans* e dois isolados de *S. mutans* foi avaliada pelo uso de bioluminescência adenosina trifosfato (ATP), baseado no sistema luciferase-luciferina. Os resultados demonstraram que a saliva foi mais efetiva para a

colonização de *S. mutans*, enquanto o soro para a colonização de *C. albicans*. Os autores sugeriram que *C. albicans* possui potencial para colonizar ou formar biofilmes sobre hidroxiapatita tanto quanto *S. mutans* porém, o fato do soro humano potencializar a colonização da levedura nesta superfície pode indicar que o mecanismo envolvido nesta colonização deve ser diferente do utilizado por *S. mutans*.

NIKAWA et al. (2001) prosseguindo seus estudos, testaram a alteração da coaderência de *C. albicans* associada a bactérias bucais (*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *Lactobacillus* e *Actinomyces*). Para este experimento, isolados de *C. albicans* associados a bactérias bucais, foram incubados em meio mínimo suplementado com 250 mM de glicose e observou-se coaderência para todos os isolados de *S. mutans* e *S. sanguis*, porém não houve coadesão significativa para *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *Lactobacillus* e *Actinomyces*. Contudo quando as leveduras foram pré-incubadas num meio mínimo suplementado com 500 mM de galactose, coaderiram com *S. salivarius* e *Actinomyces*. Em adição, a coaderência das leveduras com os isolados de *S. sanguis* foi significativamente reduzida. Esta coagregação de *C. albicans* com bactérias bucais pode ser considerada um fator de importância na ecologia de biofilmes bucais, e a presença de açúcares alterando a coaderência da levedura pode contribuir para sua sobrevivência e manutenção nas diferentes superfícies do meio bucal.

NIKAWA et al. (2003), utilizando o método ATP (bioluminescência adenosina trifosfato), em estudos de coaderência de *C. albicans* associada aos estreptococos bucais, especialmente *S. mutans*, avaliaram o potencial cariogênico de *C. albicans* comparando a habilidade desta levedura em dissolver a hidroxiapatita e concluíram que *S. mutans* é bem mais eficiente nessa dissolução após 24 horas de incubação. Ainda nesse estudo os autores observaram alta afinidade de *C. albicans* pela aderência na hidroxiapatita. Os autores sugeriram que o potencial cariogênico de *Candida albicans*, embora pequeno, reside no seu mecanismo de aderência sobre a hidroxiapatita, porém ainda não está claro se a levedura é capaz de dissolvê-la ou não. Este mecanismo poderia estar relacionado ao aumento do risco de lesões de cárie em superfícies radiculares de indivíduos idosos com baixo fluxo salivar.

De acordo com os trabalhos relatados, há evidências que *C. albicans* e *S. mutans* interagem “in vitro” pelos seus mecanismos de aderência e coagregação,

porém para que essas evidências sejam comprovadas no meio bucal, ainda há necessidade de maior quantidade de estudos pois como observado, muitos fatores devem ser considerados nessa interação.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MEIOS DE CULTURA

#### 4.1.1 Caldo BHI (Infusão de Cérebro e Coração)

BHI pó	37g
Água Destilada	1000ml

#### 4.1.2 Ágar Batata Glicose - BDA

Infusão de Batatas	200ml
Glicose	20g
Ágar	15g
Água Destilada	1000ml

O pH final foi ajustado para 5,6.

#### 4.1.3 Caldo Sabouraud

Peptona	10g
Dextrose	40g
Água Destilada	1000ml

O pH final foi ajustado para 5,6.

Para o Ágar Sabouraud, acrescentar 15g de ágar simples para cada 1000ml de meio.

#### 4.1.4 Ágar Sangue

Ágar de infusão de cérebro e coração	52g
Água Destilada	1000ml

O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH1N

Em seguida, após o resfriamento do meio a 50<sup>0</sup>C, acrescentou-se sangue desfibrinado de carneiro para uma concentração final de 10%.

#### 4.1.5 Ágar Mitis Salivarius Sacarosado com Bacitracina e Telurito de Potássio (MSBS) (GOLD et al., 1973)

Ágar Mitis Salivarius	45g
Sacarose	15g
Água Destilada	500ml
Bacitracina (sol. Estoque 50.000µg/ml)	0,30ml
Telurito de Potássio (1%)	0,50ml

pH ajustado para 7,3 – 7,4.

Misturar os ingredientes, com exceção da bacitracina e do telurito. Autoclavar a 121°C, 1atm, por 20 minutos. Quando a temperatura estiver a 50°C, acrescentar a bacitracina e o telurito e distribuir em placas de Petri pequenas.

#### 4.1.6 Caldo Gibbons e Nygaard ( GIBBONS e NYGAARD, 1968)

TSB (caldo tríptico de soja)	20g
NaCl	2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1g
MgSO <sub>4</sub>	0,12g
MnSO <sub>4</sub>	0,015g
Sacarose	50g
Água Destilada	1000ml

pH ajustado para 6,8

Para o Ágar GIBBONS e NYGAARD adicionar 20g de ágar simples para cada 1000ml de meio.

## 4.2 SOLUÇÕES E REAGENTES

### 4.2.1 Solução Salina

NaCl	8,5g
Água Destilada	1000ml

### 4.2.2 Água Peptonada

Triptona	2,5g
Peptona	2,5g
NaCl	5,0g
Água Destilada	1000ml

### 4.2.3 Fixador de Karnovisk

Glutaraldeído 25%	10ml
Paraformaldeído 10%	20ml
Tampão Cacodilato de Sódio 0,2M	25ml
CaCl <sub>2</sub> 0,1M	1ml
Água Bidestilada	44ml

Fixação: Deixar o espécime fixando na solução por no mínimo 24 horas. Lavar 2 a 3 vezes no tampão cacodilato de sódio 0,05M e proceder a desidratação.

### 4.2.4 PBS (Tampão Fosfato Salino)

Água Destilada	1000ml
NaCl	8g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15g
KCl	0,2g
NaNO <sub>3</sub>	0,2g

Misturar todos os ingredientes e ajustar o pH para 6,8.

### 4.3 ESTERILIZAÇÃO

Os meios de cultura e soluções foram esterilizados em autoclave, com pressão de 1 atm por 20 minutos. Vidrarias por 40 minutos. Todo material contaminado foi autoclavado antes do descarte. Métodos diferenciados de esterilização foram citados no item em questão.

### 4.4 LINHAGENS UTILIZADAS

Foram utilizadas linhagens de *S. mutans* e de *C. albicans*, isolados da saliva de crianças coinfectadas com *S. mutans* e *C. albicans*, atendidas na Clínica de Odontopediatria –Departamento de Estomatologia - Setor de Ciências da Saúde – UFPR, além das linhagens ATCC de *Candida albicans* 10231 gentilmente cedida pela Profa. Rosângela Lameira Pinheiro, Setor de Micologia do Hospital de Clínicas da UFPR e ATCC de *S. mutans* 25175 gentilmente cedida pela Profa. Maria Luiza Drechsel Fávero, Departamento de Farmácia da UFPR.

### 4.5 CASUÍSTICA

Para a realização das coletas salivares foram adotados os seguintes critérios de inclusão: 35 crianças de 4 a 11 anos, atendidas na Clínica de Odontopediatria da UFPR, placa bacteriana detectada visualmente sem uso de evidenciadores, nas superfícies vestibulares de pelo menos dois incisivos; dentição decídua ou mista, com ou sem atividade de cárie; não utilização de antibióticos ou antissépticos bucais por no mínimo uma semana, permissão através do termo de consentimento informado (Apêndice 4).

### 4.6 EXAME CLÍNICO

As crianças passaram por avaliação clínica, executada por único examinador, que avaliou a presença de placa bacteriana nas superfícies vestibulares dos incisivos, presença de lesões de cárie, dentes restaurados e dentes presentes. A presença de placa bacteriana na superfície vestibular dos

incisivos foi notada por exame visual, sem uso de evidenciadores de placa, sendo que, quando existia placa visível, em dois ou mais incisivos, a criança era classificada positivamente para este fator.

#### 4.7 COLETAS SALIVARES

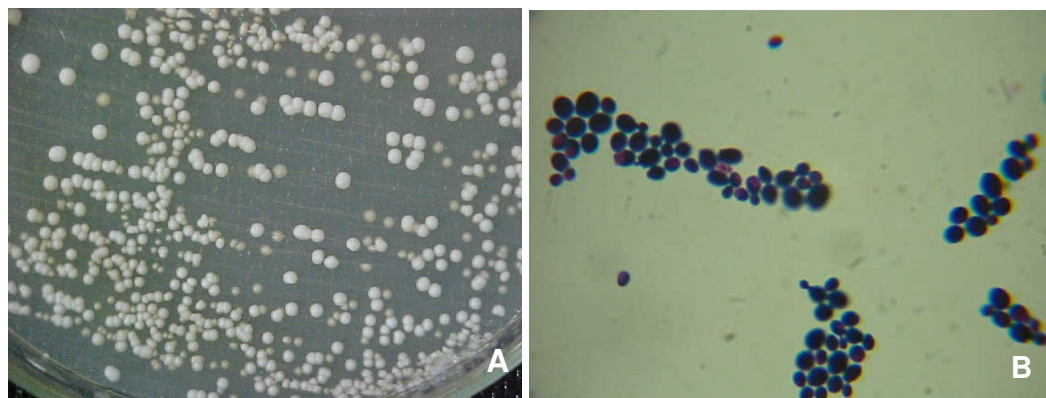
Foram realizadas coletas salivares não estimuladas, em recipientes plásticos, esterilizados, com tampa, instruindo a criança para que excretasse sua saliva dentro do recipiente até que o volume coletado fosse de aproximadamente 3 ml. O frasco contendo saliva foi transportado em recipiente térmico com gelo e a mesma processada em até 2 horas após a coleta. A mesma amostra salivar foi utilizada tanto para o isolamento de *C. albicans* como para o isolamento de *S. mutans*.

#### 4.8 ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ESTIMATIVA DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* NA SALIVA

Para o isolamento de *C. albicans*, as amostras salivares foram diluídas a  $10^{-1}$  em caldo Sabouraud, e homogeneizadas em agitador magnético. A partir desta diluição, 0,1 ml de cada amostra foi semeada em Ágar Sabouraud Dextrose, e incubada a  $30^{\circ}\text{C}$  por um período de 48 horas até 7 dias. As colônias desenvolvidas no meio de cultura foram identificadas por suas características morfológicas macroscópicas e microscópicas. Colônias esféricas, branco-foscas com aspecto de porcelana, diâmetro de 1 a 8 mm e odor característico do gênero, foram submetidas à coloração de Gram e observadas em microscópio óptico, como ilustrado na Figura 1.

A contagem estimada do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), foi realizada multiplicando-se o número de colônias pelo fator de diluição.

Todos os isolados foram repicados e conservados em Ágar Sabouraud Dextrose, em temperatura ambiente com repiques mensais.

FIGURA 1 - DESENVOLVIMENTO CARACTERÍSTICO DO GÊNERO *Candida*

(A) MACROMORFOLOGIA

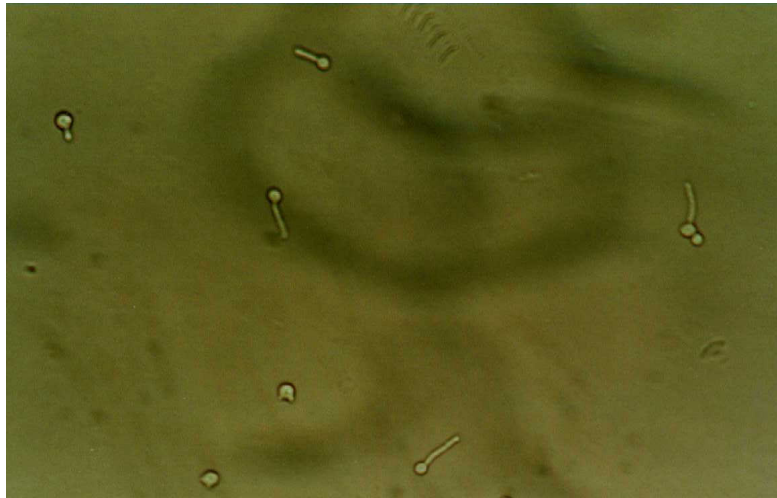
(B) MICROMORFOLOGIA EM 400X EM M.O.C.

Após a contagem, 2 colônias de cada placa foram repicadas para tubos contendo Ágar Batata Dextrose, e incubadas a 37°C por 24 horas para realização da prova de formação de tubo germinativo.

Após incubação, foi transferida uma alçada da cultura purificada crescida em Ágar Batata Dextrose para um tubo contendo 0,5ml de plasma liofilizado de coelho diluído (1:4) em solução fisiológica, adicionado traços de dextrose e incubado em banho-maria por 3 horas a 37°C. Em seguida, foi colocada uma gota da cultura em suspensão entre lâmina e lamínula e levada à observação em microscópio óptico comum para a verificação da formação do tubo germinativo em aumento de 40 vezes. A presença de tubo germinativo determinou a positividade do teste confirmando a identificação presuntiva de *Candida albicans*, como apresentado na Figura 2.

Caso não houvesse formação do tubo germinativo, a levedura analisada era inicialmente classificada como *Candida* não *albicans*.

FIGURA 2 - PRESENÇA DE TUBO GERMINATIVO – AUMENTO 400X



Para a confirmação da identificação, todos os isolados foram submetidos à identificação mecanizada através do sistema de identificação mecanizado VITEK<sup>®</sup> (PINCUS et al., 1999; KELLOGG et al., 1998). Este sistema utiliza uma placa plástica descartável com pequenas cavidades para teste de uma série de provas bioquímicas.

Para sua utilização, os isolados foram incubados em Ágar Sabouraud Dextrose, 30<sup>0</sup>C por 24 horas. Em seguida, cada cultura foi submetida à diluição padronizada com solução salina 0,45% de modo a obter através de turbidímetro que acompanha o sistema, uma porcentagem de transmitância de 46% a 56%, que corresponde à escala 2 (aproximadamente  $6,0 \times 10^8$  células/ml) de McFarland.

As culturas padronizadas foram inoculadas em cartões de identificação que carregam diferentes substratos a serem testados. Os cartões foram incubados a 30<sup>0</sup>C por 24 horas e acomodados em nichos especiais do equipamento para leitura computadorizada.

#### 4.9 ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ESTIMATIVA DE *S. mutans* NA SALIVA

Para o isolamento de *S. mutans*, foram realizadas diluições ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ) das amostras salivares em água peptonada, homogeneizadas em agitador magnético e 0,1ml de cada diluição foi semeada em Ágar Mitis Salivarius adicionado de bacitracina (30 $\mu$ g/ml de meio) e telurito de potássio (0,00005%), e incubada a 37°C por 48 horas, em microaerofilia, com uso de jarra de Gaspack.

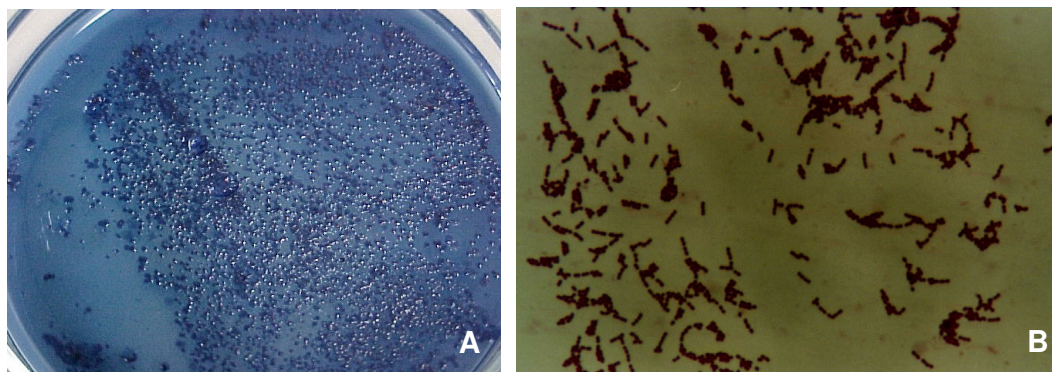
Após incubação, foi realizada a contagem estimada das colônias de estreptococos do grupo mutans multiplicando-se o número de colônias em uma área padronizada de 1cm<sup>2</sup> pelo respectivo fator de diluição.

Duas a três colônias com morfologia característica de *S. mutans* foram repicadas para meios próprios para a realização de provas bioquímicas, com a finalidade de concluir a identificação, e coradas por Gram para a análise de sua micromorfologia. A Figura 3 mostra as características macro e micromorfológicas dos estreptococos do grupo mutans.

Os isolados de *S. mutans* foram suspensos em glicerol 20% e congelados em freezer -80°C, além de repicados para placas com ágar sangue, incubados a 37°C por 48 horas, guardados em geladeira e submetidos a repiques mensais para sua conservação.



FIGURA 3 - PADRÃO DE DESENVOLVIMENTO DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS



(A) MACROMORFOLOGIA DAS COLÔNIAS (B) MICROMORFOLOGIA EM 1000X EM M.O.C.

#### 4.9.1 Provas Bioquímicas para Identificação de *S. mutans*

A caracterização bioquímica de *S. mutans* seguiu os resultados das provas recomendadas para esta espécie apresentadas na Tabela 3.

TABELA 3 - CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA UTILIZADA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE *S. mutans* (JORGE, 1998).

PROVA	POSITIVO	NEGATIVO
Catalase		X
Manitol	X	
Sorbitol	X	
Arginina		X
Esculina	X	

#### Prova da Catalase

A prova foi realizada sobre uma lâmina de vidro, colocando-se água oxigenada 3% sobre colônias características crescidas no AMSB, observando-se a formação de bolhas de gás (prova positiva).

### Prova da Fermentação do Sorbitol e Manitol

Foi adicionado 0,1ml de cultura pura do microrganismo, cultivada em meio base caldo BHI (Newprov), contendo manitol ou sorbitol e indicador de pH (púrpura de bromocresol). Incubação a 37<sup>0</sup>C por 48horas.

A prova foi considerada positiva quando ocorreu a mudança da cor do indicador de pH, de roxo para amarelo.

### Prova da Hidrólise da Esculina

Foi semeado 0,1ml de cultura pura em Ágar Esculina Inclinado. Após, incubação a 37<sup>0</sup>C por 48 horas. O desenvolvimento de coloração negra determinou a positividade da prova.

### Prova da Hidrólise da Arginina

Foi adicionado 0,1ml de cultura pura do microrganismo em meio base caldo BHI, contendo arginina e indicador de pH (púrpura de bromocresol). O tubo inoculado foi vedado com óleo mineral e incubado a 37<sup>0</sup>C por 48horas. Inicialmente, o meio muda para amarelo devido à acidificação do indicador de pH pela fermentação da glicose presente no meio. Se a arginina é descarboxilada, pela presença da enzima dihidrolase, um produto final alcalino reverte o indicador para coloração púrpura, indicando reação positiva.

## 4.10 SISTEMA DE ADERÊNCIA “IN VITRO” (YOSHIYASU, 2001)

### 4.10.1 Preparo dos Corpos de Prova

Para a realização do teste de aderência “in vitro” foram utilizados dentes pré-molares, extraídos por indicação ortodôntica e hígidos, doados através de “Termo de Doação” ( Apêndice 5), pelo próprio paciente e responsável, os quais foram mantidos em solução fisiológica com trocas semanais até o momento do preparo, que foi feito submetendo-os à profilaxia com pedra-pomes e água, com uso de escovas Robson e taças de borracha através de instrumento rotatório, em

baixa velocidade, refrigerado com água. Em seguida foram perfurados com broca diamantada esférica nº 2 com uso de instrumento rotatório em alta velocidade refrigerado com água, com o objetivo de passar um fio dental por esse orifício, facilitando assim sua manipulação. Cada dente preparado foi colocado em uma placa de Petri forrada com papel manteiga e autoclavado por 20 minutos a 121°C a 1 atmosfera.

#### 4.10.2 Preparo dos Inóculos

Isolados de *S. mutans* e de *C. albicans* provenientes de cada amostra salivar coinfetada, assim como as linhagens ATCC dos dois microrganismos foram semeados em tubos de ensaio (15 X 3) contendo volume padronizado (10ml) de caldo Gibbons e Nygaard ( GIBBONS e NYGAARD, 1968), e incubados a 37°C por 18 horas. As concentrações dos inóculos foram padronizadas em  $2,1 \times 10^9$  células/ml de acordo com escala de Mcfarland nº7 e espectrofotometria.

#### 4.10.3 Montagem do Sistema de Aderência “In Vitro”.

Em tubos de ensaio (15 X 3), com volume padronizado de 9ml de meio de cultura caldo Gibbons & Nygaard , foram acrescentados os inóculos (*S.mutans*, *C.albicans* e *S.mutans* + *C.albicans*), na alíquota de 1ml para cada tubo. No interior destes, foi adicionado um dente previamente preparado, preso por fio dental. Os tubos foram incubados a 37°C por 21 dias. Durante o período de incubação, a cada 48 horas, era realizada transferência do dente para um meio de cultura novo e coloração de Gram, com observação em microscopia óptica para a confirmação da pureza da cultura. Durante as avaliações, foram observadas a presença ou não de biofilme na superfície coronária e radicular dos dentes, formação de grumos em suspensão no meio de cultura, e precipitado no fundo dos tubos.

A Figura 4 ilustra o preparo dos corpos de prova e o sistema de aderência descrito.

FIGURA 4 - MONTAGEM DO SISTEMA DE ADERÊNCIA



(A) DENTES PRÉS-MOLARES

(B) PADRÃO DA PERFURAÇÃO

(C) SISTEMA CONFECCIONADO

#### 4.11 PREPARO DOS DENTES PARA A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após os 21 dias de incubação, os dentes foram removidos do sistema de aderência “in vitro” e preparados para a realização da Microscopia Eletrônica de Varredura através de fixação em solução de Karnovisck, lavagens com solução de tampão cacodilato de sódio a 0,05M, submetidos a cortes com a utilização de discos diamantados em instrumento rotatório Cut-off da marca Isomet, desidratados em uma seqüência de concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%), secos ao ar ambiente e metalizados no metalizador MED 010 Balzers.

Os dentes devidamente preparados foram então submetidos à observação e análise através de Microscopia Eletrônica de Varredura no Microscópio modelo Jeol JSM-6360LV do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

## 4.12 ANÁLISE QUANTITATIVA DA ADERÊNCIA

### 4.12.1 Linhagens Utilizadas

A partir das análises dos testes de aderência “in vitro” e das imagens obtidas pela Microscopia Eletrônica de Varredura, foram selecionados 4 pares de isolados de *S. mutans* e *C.albicans*, provenientes cada par, da mesma amostra salivar, que tiveram comportamentos contrastantes, e as linhagens de referência dos dois microrganismos, para um ensaio de adesão com a finalidade de realização da avaliação quantitativa da aderência “in vitro”.

### 4.12.2 Preparo dos Inóculos

Os isolados foram repicados em tubos com 20 ml de meio de cultura Gibbons & Nigaard e incubados a 37<sup>0</sup>C por 18 horas. As concentrações dos inóculos foram padronizadas em 6,0x10<sup>8</sup> células/ml de acordo com escala de Mcfarland n<sup>o</sup> 2 e espectrofotometria.

### 4.12.3 Montagem do Sistema de Aderência

Foram utilizadas cortes de acrílico de 0,5cm X 2,5cm previamente esterilizados e introduzidos em “ependorfs” contendo 0,9ml de meio Gibbons e Nigaard (GIBBONS e NYGAARD, 1968), em seguida foram acrescentados os inóculos (*S.mutans*, *C.albicans* e *S.mutans* + *C.albicans*), na alíquota de 0,1ml em cada “ependorf”. Este ensaio foi realizado em duplicata para cada inóculo analisado e com repetições para a contagem estimada das UFC/cm<sup>2</sup> aderidas após 2, 12, 24, 48 e 72 horas de incubação a 37<sup>0</sup>C, sem troca de meio de cultura.

#### 4.12.4 Avaliação Quantitativa da Aderência

Para cada tempo de incubação avaliado, desprezou-se o meio de cultura do interior do “ependorf” e foram realizadas três lavagens com tampão fosfato salino (PBS), com auxílio de pipeta de Pasteur, removendo assim as células fracamente aderidas. Em seguida, foram adicionados 1ml de PBS e 2 pérolas de vidro no interior de cada “ependorf”, agitando-os em agitador magnético por 30 seg para a liberação das células aderidas na tira de acrílico, formando uma suspensão. Para cada suspensão foram preparadas diferentes diluições ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) e semeado um volume de 0,1ml destas em Ágar Gibbons & Nigaard. Para o tempo de incubação de 2 horas usou-se a diluição  $10^{-1}$ . Para os tempos de incubação de 12 e 24 horas, foi utilizada diluição  $10^{-2}$ , e para 48 e 72 horas, diluição  $10^{-3}$ . As placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.

#### 4.12.5 Contagem Estimada das UFC/cm<sup>2</sup>

A contagem foi realizada em microscópio estereoscópico, por amostragem, baseada nas UFC/cm<sup>2</sup>, multiplicando-se o número de colônias presentes em uma área padronizada de 1cm<sup>2</sup> da placa por  $\pi \times (\text{raio da placa})^2$  e pelo fator de diluição. Esse valor foi calculado para verificação de células viáveis aderidas em uma área de 1cm<sup>2</sup> do corte de acrílico.

#### 4.12.6 Análise Estatística

Os valores médios de aderência foram avaliados pela análise de variância ANOVA, seguindo o delineamento inteiramente casualizado, com duas repetições e distribuição fatorial dos tratamentos (C, C+M, M e M+C) e tempos de cultivo (2, 12, 24, 48 e 72 horas), considerando um intervalo de confiança de 95% ( $p > 0,05$ ). As comparações múltiplas foram processadas através dos contrastes ortogonais do teste F de acordo com HINKELMANN e KEMPTHORNE (1994), com o uso dos parâmetros indicados na Tabela A7 do Apêndice 3.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

Das 35 amostras salivares analisadas, foram detectadas sete crianças coinfetadas por *C. albicans* e *S. mutans* (20%). As taxas de isolamento de *C. albicans* neste trabalho referem-se a um grupo onde 85,5% das crianças apresentavam lesões de cárie não tratadas. Observou-se, no entanto, que entre estas, foram detectadas *C. albicans* nas que exibiam maior número de lesões de cárie (32%).

Diversos autores abordam a ampla variação de prevalência de *C. albicans* na saliva. CANNON e CHAFFIN (1999) relatam variações de 1,9% a 62,3% em indivíduos saudáveis e de 6,0% a 69% em indivíduos hospitalizados sem candidíase. Segundo ARENDORF e WALKER (1980), a prevalência de portadores varia de 3% a 77% , podendo ser obtido um aumento de aproximadamente 10% de detecção da levedura em amostras salivares, com uso de “swabs” em comparação com outros métodos de coleta. REGO et al., (2003) obteve isolamento de 35% a 60% em amostras salivares de crianças de 4 a 10 anos.

Com relação à prevalência de coinfecção, KOGA-ITO et al. (2003) estudando a presença de imunoglobulinas anti *S mutans* e anti *C. albicans* em amostras salivares de crianças com fatores de risco à cárie, respiradoras bucais e grupo controle, encontraram crianças coinfetadas, porém não utilizaram esses dados em sua discussão analisando separadamente a colonização pelos microrganismos estudados.

Como a prevalência de *S. mutans* no meio bucal é considerada alta, a presença de *C. albicans* praticamente sugere alta probabilidade de coinfecção. Além disso, trabalhos demonstram a presença de *C. albicans* em canais radiculares, lesões de cárie e outros sítios da microbiota bucal onde *S. mutans* é freqüentemente isolado (AKDENIZ et al., 2002).

MOREIRA et al. 2001 avaliaram a presença de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de 239 estudantes de diferentes classes sócio-econômicas, tendo encontrado 47% de *Candida ssp* com predominância de *C. albicans*, porém não relacionaram a presença de cárie com a colonização por *C.*

*albicans*. MOALIC et al. (2001), investigando a colonização por *C. albicans* na cavidade bucal de 353 estudantes franceses associaram a atividade de cárie à presença da levedura. JORGE et al. (1997) avaliaram a colonização por *C. albicans* na cavidade bucal de 493 pacientes com relação a vários fatores predisponentes, porém neste trabalho os autores não consideraram a atividade de cárie como grupo analisado.

Devido aos fatores de colonização e virulência de *C. albicans*, sua presença em microbiotas com atividade de cárie é completamente justificável, por ser microrganismo dentinofílico, acidúrico, e com alta afinidade de aderência (AKDENIZ et al., 2002), entretanto, ao *S. mutans* é atribuída a etiologia da cárie.

Como *C. albicans* apresenta mecanismos eficientes de aderência, sua colonização no meio bucal pode representar um fator em potencial de favorecimento à interação com *S. mutans*, e alguns trabalhos têm caminhado nesta direção (MOALIC et al. 2001, AKDENIZ et al., 2002, NIKAWA et al. 2003).

Muitos estudos que abordam a interação entre os dois microrganismos, utilizam análises “in vitro”, no entanto tais experimentos são freqüentemente realizados com linhagens de referência, ou ainda em alguns trabalhos são utilizados isolados de *S. mutans* e *C. albicans* de portadores, porém, amostras provenientes de indivíduos diferentes, como em BRANTING, et al. (1989); NIKAWA et al. (1998), NIKAWA et al. (2001) e NIKAWA et al. (2003) podendo não refletir a interação real na cavidade bucal. Sendo assim, as amostras isoladas para este trabalho fornecem um ponto de partida para ampla fonte de discussão.

O padrão de isolamento e características dos portadores estão descritos na Tabela 4.



TABELA 4 - PADRÃO DE ISOLAMENTO DAS AMOSTRAS SALIVARES

Amostra salivar	<i>S. mutans</i> UFC/ml saliva	<i>C. albicans</i> UFC/ml saliva	<i>C. parapsilosis</i> UFC/ml saliva	Dentes com experiência de cárie	Presença de lesões de cárie não tratadas	Idade
1	3.11×10 <sup>5</sup>	ND	ND	Sim	9	9
2	ND	ND	ND	Não	3	9
3	1.80×10 <sup>5</sup>	2.80×10 <sup>2</sup>	ND	Sim	5	5
4	ND	ND	1.23×10 <sup>2</sup>	Não	2	7
5	ND	ND	ND	Sim	5	8
6	ND	3.20×10 <sup>2</sup>	ND	Sim	5	8
7	4.37×10 <sup>5</sup>	3.10×10 <sup>2</sup>	ND	Sim	9	4
8	4.48×10 <sup>5</sup>	ND	ND	Sim	6	6
9	2.24×10 <sup>5</sup>	ND	ND	Sim	7	9
10	ND	1.90×10 <sup>2</sup>	ND	Sim	7	8
11	3.10×10 <sup>5</sup>	2.25×10 <sup>2</sup>	ND	Sim	8	7
12	9.80×10 <sup>4</sup>	ND	ND	Sim	4	11
13	ND	ND	1.52×10 <sup>2</sup>	Sim	7	11
14	ND	1.10×10 <sup>2</sup>	ND	Sim	5	8
15	1.67×10 <sup>5</sup>	ND	ND	Sim	4	9
16	2.45×10 <sup>5</sup>	ND	ND	Sim	3	9
17	5.91×10 <sup>5</sup>	1.5×10 <sup>2</sup>	ND	Sim	10	8
18	1.12×10 <sup>5</sup>	ND	ND	Sim	3	8
19	3.20×10 <sup>5</sup>	ND	ND	Sim	5	8
20	ND	ND	ND	Sim	6	6
21	ND	ND	ND	Sim	5	8
22	8.64×10 <sup>5</sup>	1.46×10 <sup>2</sup>	ND	Sim	6	5
23	ND	ND	ND	Sim	4	7
24	4.97×10 <sup>5</sup>	1.29×10 <sup>2</sup>	ND	Sim	7	5
25	ND	ND	ND	Sim	4	5
26	3.18×10 <sup>5</sup>	ND	ND	Não	3	11
27	ND	ND	ND	Não	2	10
28	ND	1,3X10 <sup>2</sup>	ND	Sim	4	5
29	ND	ND	ND	Sim	6	4
30	ND	ND	ND	Sim	6	11
31	5.23×10 <sup>5</sup>	2.60×10 <sup>2</sup>	ND	Sim	4	6
32	ND	ND	ND	Sim	3	5
33	5.60×10 <sup>5</sup>	ND	ND	Não	4	6
34	ND	ND	ND	Sim	2	5
35	ND	ND	ND	Sim	4	9

ND = Não detectado. Dentes com experiência de cárie = dentes cariados, perdidos por cárie ou restaurados. Presença de lesões de cárie não tratadas = foram consideradas lesões de cárie com cavitação, em atividade ou não.

Com relação ao isolamento das leveduras do gênero *Candida*, observou-se que são menos exigentes quanto ao seu manuseio em laboratório, sendo seu isolamento mais fácil, quando comparado ao de *S. mutans*, o que pode explicar a maior facilidade de recuperação destes microrganismos das amostras salivares. MOALIC et al. (2001) apontam que se realmente a colonização por *C. albicans* for um fator microbiológico importante no processo de desenvolvimento de cárie, como um fator preditivo, seu isolamento seria muito mais fácil do que o de *S. mutans*, porém há necessidade de estudos longitudinais sobre a colonização desta levedura para obtenção de dados mais consistentes.

Analisando a taxa de isolamento de *S. mutans* (49%) das amostras salivares, foi verificado uma porcentagem menor quando comparado com alguns relatos na literatura. KOGA – ITO et al. (2003), analisando uma população de crianças respiradoras bucais encontraram uma prevalência de 75%. NAPIMOGA (2004), analisando a clonalidade de *S. mutans* em pares mãe/filho encontrou uma prevalência de 80% nas amostras salivares das crianças e 100% nas amostras salivares das mães. AZEVEDO et al., (1998), avaliando as espécies de estreptococos do grupo mutans isolados de amostras salivares de pares mãe/filho detectaram 94% de *S. mutans* nas crianças e 100% nas mães.

A taxa de isolamento de *S. mutans* neste trabalho (49%), pôde ser explicada pela metodologia utilizada na coleta e pelo número de colônias isoladas de cada amostra para identificação, que foi de 2 a 3. NAPIMOGA (2004), utilizou amostras de saliva não estimulada para o isolamento de *S. mutans*, porém também utilizou amostras de placa bacteriana e saburra lingual, selecionando em média, após crescimento colonial, 10 a 15 colônias de cada amostra para as provas bioquímicas, perfazendo um total de aproximadamente 45 colônias de cada paciente, conseguindo uma porcentagem de detecção de *S. mutans* de 80%.

Alguns outros autores como AZEVEDO et al., (1998), MATTOS-GRANER (1999), PETTI e HAUSEN (2000), utilizaram a metodologia de coleta proposta por KÖHLER e BRATTHALL (1979), utilizando espátulas de madeira que após serem umedecidas por saliva eram pressionadas sobre a superfície de Ágar Mitis Salivarius Bacitracina e em seguida acondicionadas em sacos plásticos com ar expirado e assim incubadas, esses autores obtiveram taxa de isolamento de *S. mutans*, em torno de 80% a 90%.

Durante as observações de rotina para o isolamento de *S. mutans*

observou-se que quando as diluições das amostras salivares eram efetuadas em água peptonada havia uma maior positividade no isolamento, o mesmo observou-se com relação ao isolamento de leveduras utilizando caldo Sabouraud, tal fato não tem sido relatado, e a solução mais freqüentemente utilizada para as diluições é a solução salina.

Ainda de acordo com observações referentes ao isolamento de *S. mutans*, a morfologia colonial foi bastante diferenciada entre os isolados, indicando assim a necessidade de selecionar para as provas bioquímicas não somente colônias com a mesma característica morfológica, e sim com as várias morfologias encontradas.

## 5.2 ANÁLISE QUALITATIVA DA ADERÊNCIA “IN VITRO”

Foram selecionados para o teste de aderência, os isolados de *S. mutans* e de *C. albicans* obtidos de amostras salivares coinfectadas, além de linhagens ATCC de *C. albicans* e de *S. mutans*, cuja nomenclatura encontra-se descrita na Tabela 5, que, após terem sido inoculados no sistema de aderência foram avaliados a cada 48 horas, período estabelecido para as trocas do meio de cultura para que este fornecesse substrato adequado ao crescimento microbiano antes de atingir a fase de declínio, e durante 21 dias (YOSHIYASU, 2001; PELINO, 1998), período no qual o esmalte dentário começa sofrer os efeitos de desmineralização pela placa bacteriana constituída por *S. mutans*, em meio rico em sacarose.

TABELA 5 - NOMENCLATURA DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NOS TESTES DE ADERÊNCIA  
“IN VITRO”

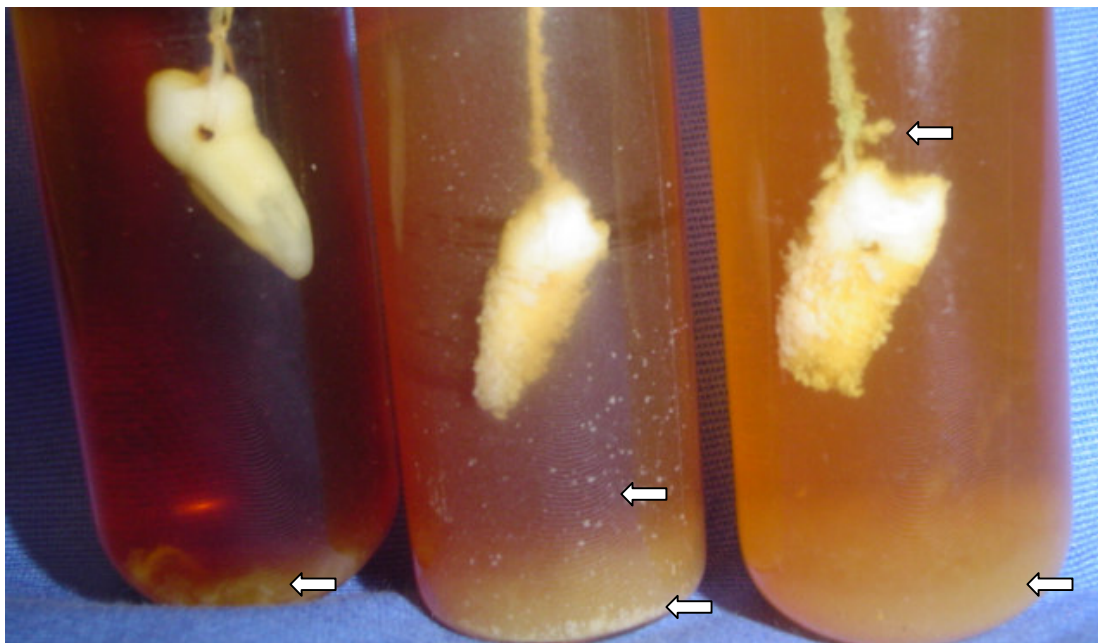
Nomenclatura dos Isolados	Microrganismo	Amostra Salivar
M1	<i>S. mutans</i>	3
C1	<i>C. albicans</i>	3
M2	<i>S. mutans</i>	7
C2	<i>C. albicans</i>	7
M3	<i>S. mutans</i>	11
C3	<i>C. albicans</i>	11
M4	<i>S. mutans</i>	17
C4	<i>C. albicans</i>	17
M5	<i>S. mutans</i>	22
C5	<i>C. albicans</i>	22
M6	<i>S. mutans</i>	24
C6	<i>C. albicans</i>	24
M7	<i>S. mutans</i>	31
C7	<i>C. albicans</i>	31
M	<i>S. mutans</i>	Linhagem ATCC
C	<i>C. albicans</i>	Linhagem ATCC

C = *C. albicans* ; M = *S. mutans*. O número ao lado de M ou C indica a ordem da obtenção do isolado. Amostra salivar indica a procedência do isolado conforme Tabela 4.

Durante os testes de aderência, buscou-se avaliar uma possível relação entre *C. albicans* e *S. mutans*, para isso foram feitos sistemas de aderência compostos por isolados de *S. mutans* e *C. albicans* separadamente e juntos, sempre provenientes da mesma amostra salivar.

À medida que as observações eram realizadas durante o tempo de incubação proposto, foi possível classificar os isolados em sistemas contendo apenas *C. albicans*, apenas *S. mutans* e sistemas com os dois microrganismos associados, pois o comportamento dentro de cada grupo teve poucas variações, sendo o isolado de *S. mutans* M4 o que parecia ter maior atividade de aderência, este isolado era proveniente de uma criança com o maior número de dentes com lesões de cárie. Durante o cultivo foi verificada a potencialização da aderência quando os dois microrganismos eram cultivados juntos (Figura 5).

FIGURA 5 – COMPORTAMENTO DOS SISTEMAS DE ADERÊNCIA DURANTE INCUBAÇÃO



Da esquerda para a direita: sistema com *C. albicans*, *S. mutans* e microrganismos associados. As setas indicam precipitado no fundo do tubo e formação de grumos no meio de cultura.

De acordo com a Figura 5 foi possível observar a presença aumentada de grumos, e precipitado (setas).

Nos resultados obtidos pelas análises macroscópicas das amostras salivares foi verificado um padrão de aderência semelhante entre os isolados das amostras salivares e aqueles compostos por linhagens ATCC de *C. albicans* e *S. mutans*. A aparente estabilização da aderência de todos os sistemas aconteceu por volta do 16° dia de incubação.

No final do período de cultivo avaliado observou-se macroscopicamente no grupo onde o inóculo era *C. albicans*, ausência de biofilme visível (Figura 6A), enquanto que no inóculo constituído por *S. mutans*, a formação de biofilme foi visualizada, porém com espessura menor quando comparado ao grupo que havia sido incubado com os dois microrganismos (Figura 6B). Quando os microrganismos estavam associados, houve maior espessura do biofilme. Tal fato foi verificado tanto na superfície radicular como coronária, indicando uma intensa interação entre eles (Figura 6C).

FIGURA 6 - FORMAÇÃO DE BIOFILME APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO



(A) *C. albicans*; (B) *S. mutans* e (C) *S. mutans* + *C. albicans*.

As características observadas durante o período de incubação (formação de grumos no meio de cultura, presença de biofilme na raiz e coroa dentária e presença de precipitado no fundo do tubo), foram classificadas de 0 a 5 conforme a intensidade da característica observada e estão apresentadas no Apêndice 1 (Tabela A1).

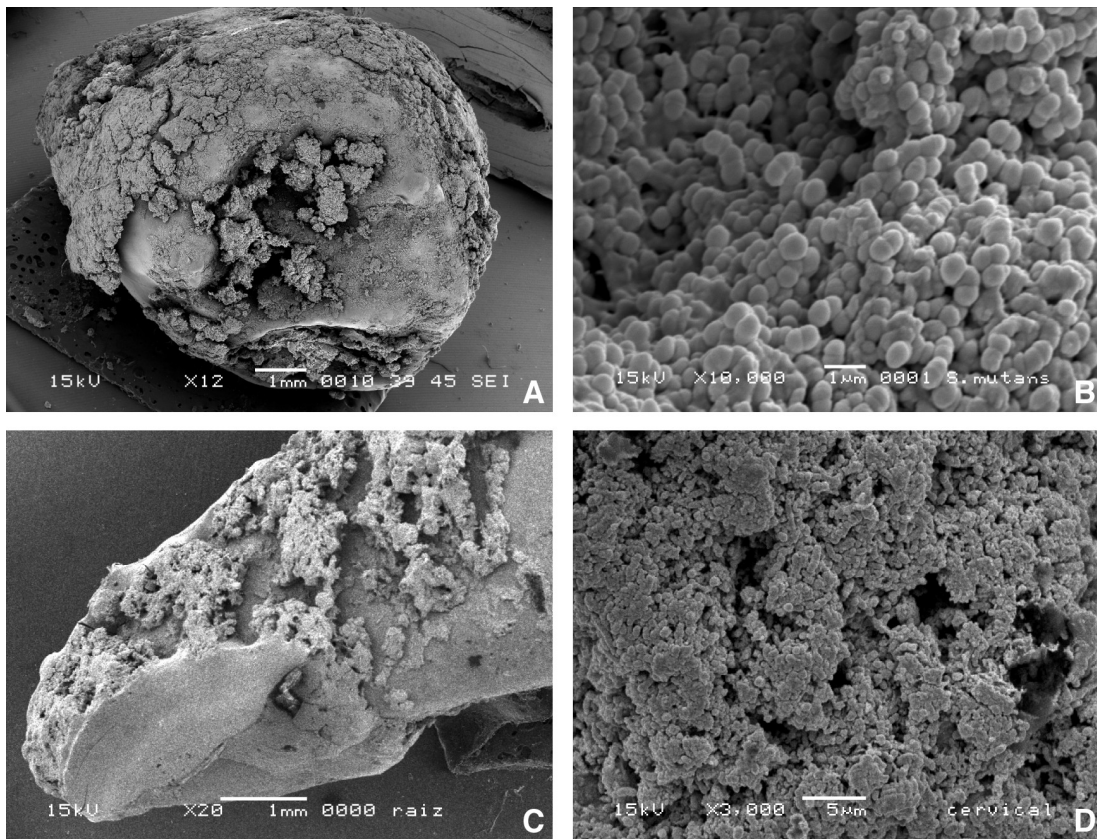
A partir destes dados, pôde-se verificar que quando *S. mutans* e *C. albicans* eram cultivados juntos, parecia haver um aumento considerável no desenvolvimento dos dois microrganismos.

Durante a realização de cortes dos dentes para Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.), observou-se que o biofilme desenvolvido pelos microrganismos associados apresentava-se firmemente aderido, não exibindo perda do mesmo, detectada visualmente durante o procedimento, enquanto que nos dentes inoculados com *S. mutans*, embora tivessem desenvolvido espessura considerável de biofilme, apresentavam freqüentemente pequena perda deste durante o processamento dos cortes. Quanto aos elementos dentários inoculados com *C. albicans* nenhuma observação nesse sentido foi constatada, pois os mesmos não exibiam em sua superfície biofilme que pudesse ser visualizado.

Pelas análises por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.) foi possível visualizar comparativamente a aderência dos três grupos, observada macroscopicamente.

As imagens revelaram que o *S. mutans* aderiu à superfície dental, tanto na coroa como na raiz, formando um biofilme espesso e compacto, com suas células agrupadas intimamente. O padrão dessa aderência está apresentado na Figura 7.

FIGURA 7 - ELETROMICROGRAFIA DO PADRÃO DE ADERÊNCIA DE *S. mutans* ISOLADAMENTE



- (A) - coroa dental, aumento 12X mostrando densa camada de biofilme.  
 (B) - células de *S. mutans*, aumento 10.000 X mostrando arranjo das células.  
 (C) - raiz dental, aumento 20X, maior acúmulo de biofilme na região apical.  
 (D) - células de *S. mutans*, na superfície radicular, aumento 3.000 X mostrando intensa compactação das células.

Estudos “in vitro” da aderência de *S. mutans* utilizam diferentes métodos de avaliação, como contagem de UFC, turbidimetria, cintilografia e M.E.V., porém, com tempos de incubação sempre bastante inferiores e utilizando como corpos de prova, diferentes materiais, portanto não exibindo o padrão de aderência obtido neste trabalho.

PELINO (1998) e YOSHIYASU (2001), utilizaram sistema de aderência com *S. mutans* em superfície dentária, onde a análise por M.E.V. era realizada com objetivo de verificar a estrutura dental submetida à ação da placa bacteriana, sendo necessário para isso a prévia remoção do biofilme formado durante o período de



incubação, não oferecendo, portanto informações quanto a aderência e arranjo celular de *S. mutans* nessas condições. Sendo assim, o padrão de aderência de *S. mutans* obtido por M.E.V. neste trabalho foi revelador, pois possibilitou visualizar com clareza o aumento no número de células e a formação dos agregados. Além disso, estes dados forneceram subsídios expressivos para a avaliação da relação deste microrganismo com *C. albicans*.

Quando *C. albicans* foi analisada isoladamente, ao contrário da observação macroscópica, que sugeria não existir biofilme formado, verificou-se por meio de M.E.V. a presença de células com morfologia filamentosa além de leveduriformes, aderidas na superfície dental, tanto na coroa como raiz (Figura 8), formando assim um biofilme bem menos denso do que o observado na análise dos outros grupos. Isto explica a não observação macroscópica deste achado.

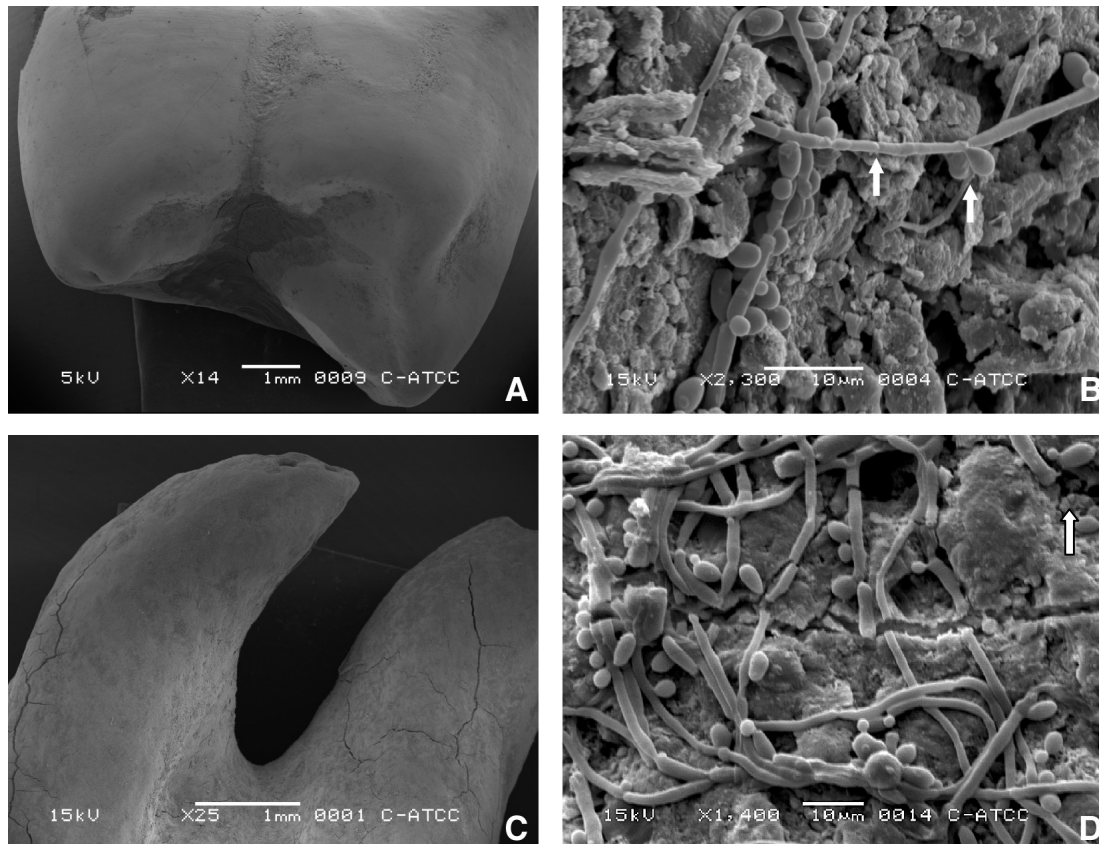
SEN et al., (1997), estudando o padrão de crescimento de *C. albicans* na dentina radicular de dentes pré-molares desprezou o terço apical e coronário destes elementos e os incubou em meio de cultura tioglicolato com trocas diárias por até 15 dias. Seus resultados foram analisados por M.E.V. e revelaram predominância de células leveduriformes de *C. albicans* no interior dos túbulos dentinários das raízes. Os autores observaram outras formas morfológicas, como tubos germinativos, hifas verdadeiras, clamidoconídeos e pseudohifas. Neste trabalho os autores ressaltam a afinidade de *C. albicans* pela dentina e a capacidade de invasão de canais radiculares, sendo este um fator a ser levado em consideração em terapias endodônticas.

A observação de diferentes formas morfológicas encontradas quando *C. albicans* foi incubada isoladamente, pode sugerir que a ausência de competição favorecia a produção de filamentos e provavelmente a invasão tecidual da levedura. Porém foi evidente que esta aderência não foi tão efetiva quanto nos outros grupos.

*C. albicans* é capaz de variar sua morfologia entre a forma de blastoconídeos e hifas. Esta plasticidade fenotípica vem sendo relacionada a genes que promovem alterações fenotípicas e que parecem ter sua ativação mediada por fatores ambientais, entre os quais o pH parece ser um fator de relevância (SOLL, 2002). YOSHIYASU, (2001), utilizando semelhante sistema de aderência mediu o pH do meio de cultura durante a incubação e verificou valores próximos a 4,3. Provavelmente neste trabalho, o pH, além da ausência física do *S. mutans*, pode ter sido um dos

fatores que explicam a predominância das formas filamentosas nestas condições de cultivo.

FIGURA 8 - ELETROMICROGRAFIA DO PADRÃO DE ADERÊNCIA DE *C. albicans* ISOLADAMENTE



- (A) - coroa dental, aumento 14X mostrando fina camada de biofilme formado por *C. albicans*.
- (B) - células de *C. albicans*, aumento 2.300 X mostrando arranjo das células em sua morfologia filamentososa (seta), exibindo brotamento (seta).
- (C) - raiz dental, aumento 25X, acúmulo de fina camada de biofilme formado por *C. albicans*, similar ao encontrado na coroa.
- (D) - células de *C. albicans*, aumento 1.400 X mostrando arranjo celular de *C. albicans* na superfície radicular, com morfologia filamentososa e leveduriforme em brotamento (seta).

Segundo SOLL (2002), todas as morfologias de *C. albicans* podem estar associadas com comensalismo e doença, embora por longo tempo acreditou-se que a forma leveduriforme era predominantemente associada ao comensalismo e a forma filamentosa com sua penetração nos tecidos, associada à doença. Atualmente, parece que embora esta transição fenotípica ocorra, existem questionamentos sobre o papel exercido na patogênese, estudos caminham para explicar tal evidência.

Analisando as imagens de M.E.V. da aderência de *S. mutans* e *C. albicans*, associados, observou-se aumento na concentração do biofilme e maior uniformidade em toda a superfície dental analisada, formando uma rede, constituída pelas células dos dois microrganismos em meio a uma substância amorfa.

Quanto às células de *C. albicans*, durante associação, apresentava predominância de morfologia unicelular, com formação de blastoconídeos podendo ser explicada pela presença de *S. mutans* e seus produtos metabólicos, os quais pareciam exercer uma função facilitadora na coagregação dos dois microrganismos, promovendo um aumento do crescimento das células leveduriformes, porém dificultando a expressão das formas filamentosas, embora tubos germinativos foram observados.

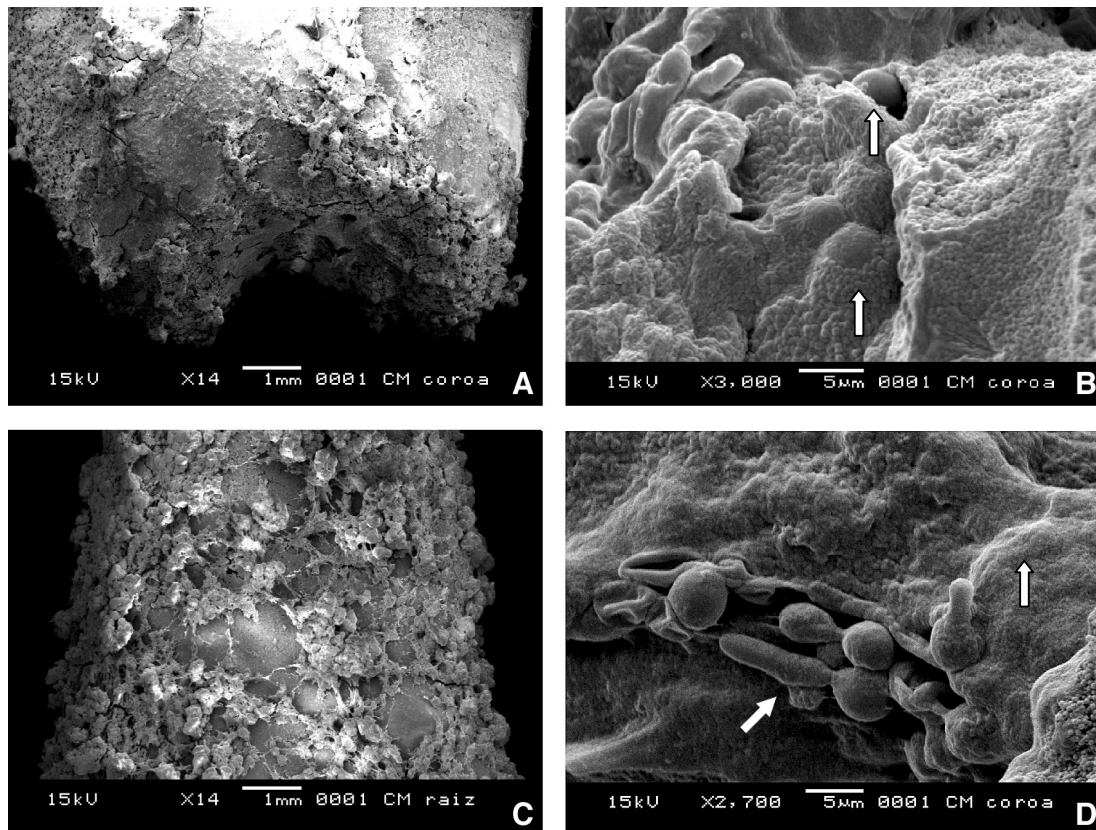
NIKAWA et al. (2001) em análises de coaderência entre *C. albicans* e bactérias bucais também encontraram maior presença de blastoconídeos de *C. albicans* durante a coadesão com *S. mutans* em meio suplementado com sacarose. Analisando essa coagregação os autores a consideraram de grande importância na ecologia dos biofilmes bucais.

Observando as células de *S. mutans* durante a associação, notou-se que estas recobriram a superfície das células da levedura, mostrando que pode haver aumento de colonização por *S. mutans* quando esta bactéria se encontra em associação com *C. albicans*.

Estas observações estão apresentadas na Figura 9. Nota-se que tanto o biofilme coronário 9(A) como o radicular 9(C) mostrou uniformidade e aumento expressivo na aderência. Em 9(B) pode-se observar células de *S. mutans* recobrando completamente as células da levedura, na presença de substância amorfa, e células da levedura em fase inicial da colonização pelo *S. mutans*. Em 9 (D), a presença de tubos germinativos e a constante presença de substância

amorfa e células de *S. mutans*.

FIGURA 9 - ELETROMICROGRAFIA DO PADRÃO DE ADERÊNCIA de *C. albicans* ASSOCIADA A *S. mutans*.



- (A) - coroa dental, aumento 14X mostrando presença de biofilme denso e uniforme formado por *C. albicans* em associação ao *S. mutans*.
- (B) - células de *C. albicans* em associação ao *S. mutans* aumento 3000 X mostrando a relação existente entre elas. Notar a presença das células de *S. mutans* recobrimo as células da levedura (seta), e uma célula de levedura no início da colonização por *S. mutans* (seta), em meio à substância amorfa, parecendo facilitar a aderência.
- (C) - raiz dental, aumento 14X, acúmulo uniforme de biofilme formado por *C. albicans* associada ao *S. mutans* similar ao encontrado na coroa.
- (D) - aumento 2700X mostrando presença de tubos germinativos de *C. albicans* (seta), em meio à substância amorfa (seta) e células de *S. mutans*.

Comparando a aderência obtida pelos dois microrganismos associados, com o trabalho realizado por BRANTING et al. (1989), observou-se que embora a superfície analisada pelos referidos autores fosse o acrílico, o comportamento das células dos dois microrganismos nesta associação foi de certa forma similar ao observado neste trabalho.

Em BRANTING et al. (1989), os autores sugerem que o incremento na formação do biofilme por *C. albicans* dependeria da presença de glucanos insolúveis que produzidos pelos *S. mutans* aumentaria a capacidade de adesão da levedura. A associação dos dois microrganismos em meio contendo sacarose pode facilitar ainda mais essa interação que poderia ser entendida como uma relação de cooperação. Esses autores também relataram a presença de uma substância amorfa facilitando esta coagregação, e sugeriram ser polissacarídeos extracelulares produzidos por *S. mutans* e que o possível mecanismo pelo qual *C. albicans* se ligaria aos diferentes materiais quando associada ao *S. mutans* seria por adesão célula-célula (coagregação).

Tal fato explicaria a formação dos agregados no meio de cultura, observados neste trabalho, quando os dois microrganismos foram cultivados conjuntamente. O aumento de células observado no crescimento conjugado pode ser explicado pelo metabolismo do *S. mutans*, inclusive alguns trabalhos reforçam essa coagregação quando cultivam os dois microrganismos sem a presença de um suporte físico, como NIKAWA et al. (2001), que embora não tivessem utilizado qualquer tipo de material de suporte para o estudo da coaderência, puderam observar por M.E.V. os coagregados compostos pelas células bacterianas recobrimo a superfície das células leveduriformes de *C. albicans*.

Além disso, talvez a coagregação dos dois microrganismos pudesse explicar a maior eficiência na aderência do biofilme, durante os cortes dos dentes.

A intensidade da colonização por *S. mutans* foi muito evidente quando cultivado na presença de *C. albicans*. (Figura 9B), indicando que *S. mutans* pareceu ter sido o mais favorecido nesta associação, onde o aumento de células da levedura pode ter inclusive gerado aumento de suporte para aderência.

Comparando o comportamento de aderência dos isolados provenientes das amostras salivares com o comportamento obtido pelas linhagens ATCC de *C. albicans* e *S. mutans*, observou-se padrão de aderência similar à Microscopia Eletrônica de Varredura.

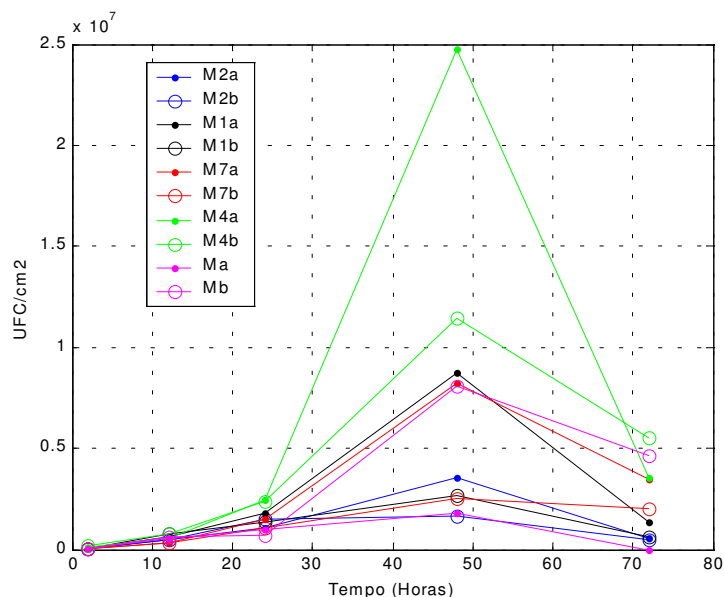
### 5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DA ADERÊNCIA “IN VITRO”.

Para a confirmação dos resultados obtidos pela análise qualitativa, foi proposto um sistema “in vitro” que permitisse a padronização de uma superfície que pudesse ser avaliada quantitativamente em relação à aderência, devido a natureza biológica dos dentes não permitir este modelo. Foi então desenvolvido um sistema acrílico baseado nos diferentes trabalhos de aderência “in vitro” relatados na literatura, como membranas de ultrafiltração ALDSWORTH e MACFARLANE (2001), cortes de vidro NIKAWA et al. (2003), pérolas de hidroxiapatita NIKAWA et al. (1998) ou acrílico BRANTING et al., (1989).

A análise da aderência à superfície acrílica foi feita para os isolados de *S. mutans* (M1, M2, M4, M7), e *C. albicans* (C1, C2, C4, C7), que apresentaram comportamentos de aderência contrastantes dentro de seus grupos, e linhagens de referência dos dois microrganismos, por meio de contagem estimada das UFC/cm<sup>2</sup> em função do tempo de incubação, nos períodos de 2, 12, 24, 48 e 72 horas, incluindo os diferentes grupos: sistemas com *C. albicans*, *S. mutans* e os dois microrganismos associados.

#### 5.3.1 Avaliação da Aderência de *S. mutans*

A Tabela A2 do apêndice 2 apresenta os valores encontrados em UFC/cm<sup>2</sup> para a análise de aderência “in vitro” dos isolados de *S. mutans*. As informações apresentadas na referida tabela encontram-se sumarizadas graficamente na Figura 10.

FIGURA 10 - COMPORTAMENTO DE ADERÊNCIA *S. mutans* EM UFC/cm<sup>2</sup>

De acordo com a Figura 10, observou-se que houve certa uniformidade no padrão de aderência para todas as amostras até as 24 horas de incubação, e que após este período houve um acentuado aumento na aderência. Verificou-se ainda que as maiores médias foram obtidas para o período de 48 horas e que os valores referentes ao isolado de *S. mutans* M4, foram superiores às demais, para este período.

Para o tempo de 72 horas houve decréscimo na aderência, talvez pelo fato de após 48 horas as bactérias iniciarem a fase de declínio. Isso poderia explicar o incremento do biofilme no sistema de aderência realizado com dentes durante o período de incubação de 21 dias, pois nesse sistema o meio de cultura era trocado a cada 48 horas, portanto havia demanda de substrato para o crescimento de *S. mutans*, o que não ocorreu neste segundo experimento.

Sabe-se que entre os diferentes sorotipos de *S. mutans*, principalmente com relação à expressão da aderência, existem variações entre isolados de indivíduos diferentes e até no mesmo indivíduo (MATTOS-GRANER, 1999). Esta constatação pode justificar as variações encontradas na capacidade de aderência entre as diferentes amostras de *S. mutans* analisadas (Figura 10).

Neste trabalho observou-se que os isolados de *S. mutans* obtidos de indivíduos com atividade de cárie, apresentavam variações quanto à aderência, onde o isolado de maior capacidade de aderência (M4), foi obtido de um indivíduo

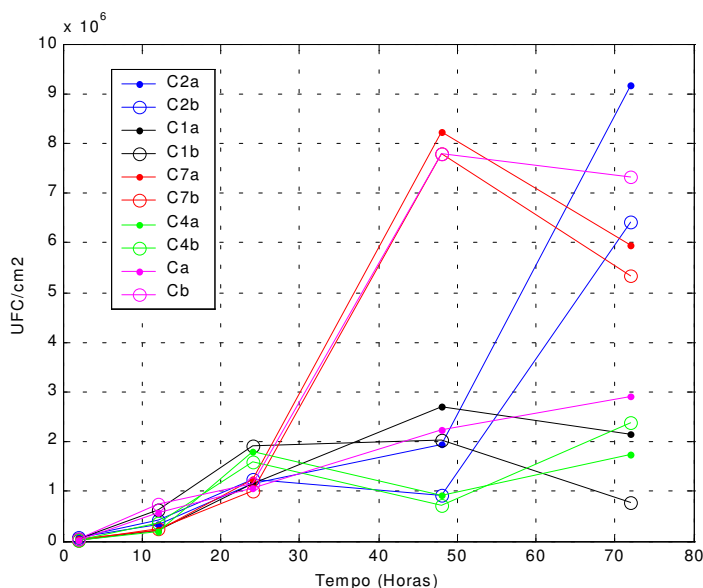
com alto número de lesões cárias (Tabela 3).

Estes dados revelam informações importantes para a discussão já existente e relatada da relação entre a concentração de *S.mutans* na saliva e atividade de cárie. A literatura revela que *S. mutans* quando presente em altas concentrações na microbiota bucal é freqüentemente responsável pelo aumento de atividade de cárie, porém tem sido observada a existência de indivíduos com alta contagem e baixa atividade de cárie (PETTI, 1997). Embora fatores exógenos como dieta e higiene possam ser responsabilizados por esta evidência, alguns autores têm reforçado a hipótese da existência de sorotipos mais cariogênicos, os quais apresentariam maior capacidade de aderência e metabolismo mais expressivo durante a formação da placa bacteriana, justificando assim essa relação contraditória da concentração de *S. mutans* na saliva e atividade de cárie (ALALUUSUA et al., 1996).

### 5.3.2 Avaliação da Aderência de *C.albicans*

A Tabela A3 do apêndice 2 apresenta os valores encontrados em UFC/cm<sup>2</sup> para análise da aderência “in vitro” dos isolados de *C. albicans*. As informações mostradas na referida tabela encontram-se sumarizadas graficamente na Figura 11.



FIGURA 11 - COMPORTAMENTO DE ADERÊNCIA DE *C. albicans* EM UFC/cm<sup>2</sup>

Verificou-se que os valores médios de aderência para todos os períodos avaliados foram menores do que os obtidos para *S. mutans*. Analisando o tempo de 24 horas, houve padrão de aderência similar aos isolados do grupo incubado apenas com *S. mutans*, porém, após este período, houve grande variação no número de UFC/cm<sup>2</sup> entre os isolados de *C. albicans*, diferente do padrão de aderência de *S. mutans*, onde praticamente todos os isolados tiveram o mesmo comportamento durante todo o período analisado.

Em particular, o isolado de *C. albicans* C2 exibiu comportamento bastante diferenciado dos outros após 48 horas, apresentando um aumento em sua aderência, enquanto a maior parte mostrou uma diminuição.

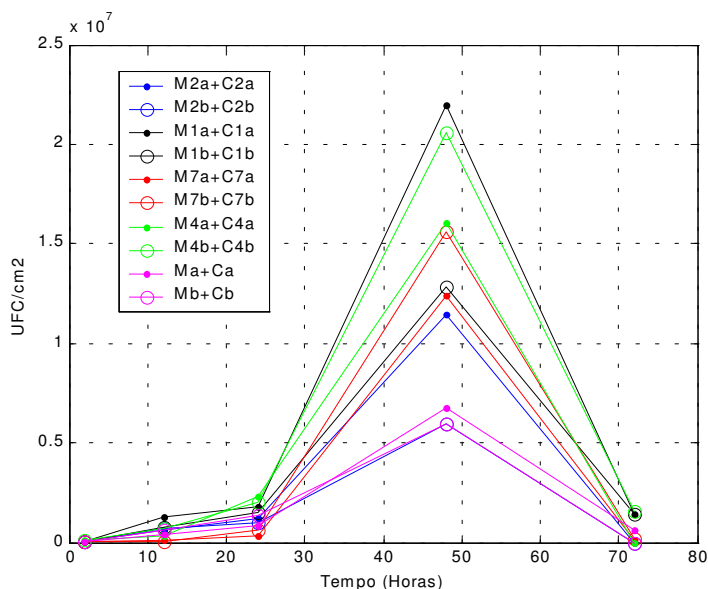
Ainda é importante ressaltar que alguns pares de isolados tiveram comportamentos de aderência opostos quando cultivados separadamente, como o isolado de *S. mutans* M4 (Figura 10), que apresentou a maior aderência em contraste com o C4 (Figura 11), que obteve aderência inferior nas mesmas condições. Observou-se ainda que em 72 horas a diminuição da aderência dos isolados de *C. albicans* não foi tão acentuada, como ocorrido para *S. mutans*, e em alguns casos continuou aumentando, indicando que neste período a levedura ainda foi capaz de sobreviver.

Ainda a Figura 11 pode-se observar uma considerável variação na capacidade aderência entre isolados *C. albicans*, assim como observado para *S. mutans*.

### 5.3.3 Avaliação da Aderência de *S. mutans* Associado a *C. albicans*.

A Tabela A4 do apêndice 2 apresenta os valores estimados de aderência de *S. mutans* em UFC/cm<sup>2</sup> quando em associação. As informações obtidas na referida tabela encontram-se sumarizadas graficamente na Figura 12.

FIGURA 12 - COMPORTAMENTO DE ADERÊNCIA DE *S. mutans* ASSOCIADO EM UFC/cm<sup>2</sup>



Notou-se que quando *S. mutans* estava associado à *C. albicans*, a presença da levedura promoveu um acentuado aumento de aderência na maior parte dos isolados analisados. É importante ressaltar o isolado M1a que apresentava um baixo valor de UFC/cm<sup>2</sup> quando incubado isoladamente (Figura 10), na presença da levedura apresentou aumento considerável de aderência (Figura 12), sendo inclusive entre todos os isolados o que apresentou o maior aumento de aderência quando cultivado na presença da levedura, demonstrando

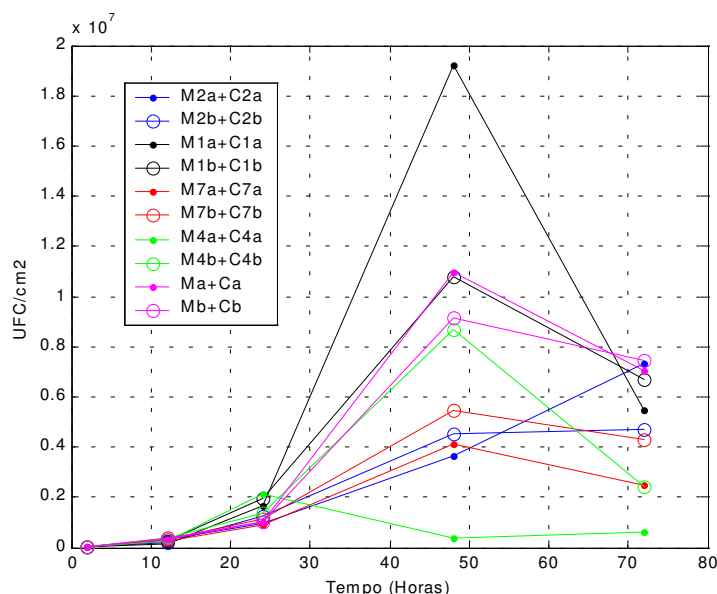
que a presença de *C. albicans* pode contribuir para o aumento da aderência de *S. mutans*. Isto ainda sugere que a coinfeção parece potencializar a capacidade de aderência de amostras que isoladamente não eram tão eficientes. Tal evidência poderia representar clinicamente que indivíduos portadores de *S. mutans* de baixa virulência, quando infectados por *C. albicans* teriam um risco aumentado no desenvolvimento de lesões cárias.

Observou-se ainda que as linhagens de referência de *S. mutans*, exibiram menor poder de aderência que o obtido pelos isolados provenientes das amostras salivares coinfectadas.

Algumas amostras de *S. mutans* associadas, no período de 72 horas não exibiram crescimento colonial, porém a mesma associação, quando submetida à contagem de aderência de *C. albicans*, apresentaram valores positivos (Tabelas A4 e A5 do Apêndice 2). Este fato pode ter ocorrido em consequência de acentuado declínio de *S. mutans* em 72 horas, ao passo que *C. albicans*, neste período ainda apresentou padrão de aderência crescente.

#### 5.3.4 Avaliação da Aderência de *C. albicans* Associada ao *S. mutans*

A Tabela A5 do Apêndice 2 apresenta os valores estimados da aderência de *C. albicans* em UFC/cm<sup>2</sup> quando em associação. As informações mostradas na referida tabela encontram-se sumarizadas graficamente na Figura 13.

FIGURA 13 -COMPORTAMENTO DE ADERÊNCIA DE *C. albicans* ASSOCIADA EM UFC/cm<sup>2</sup> .

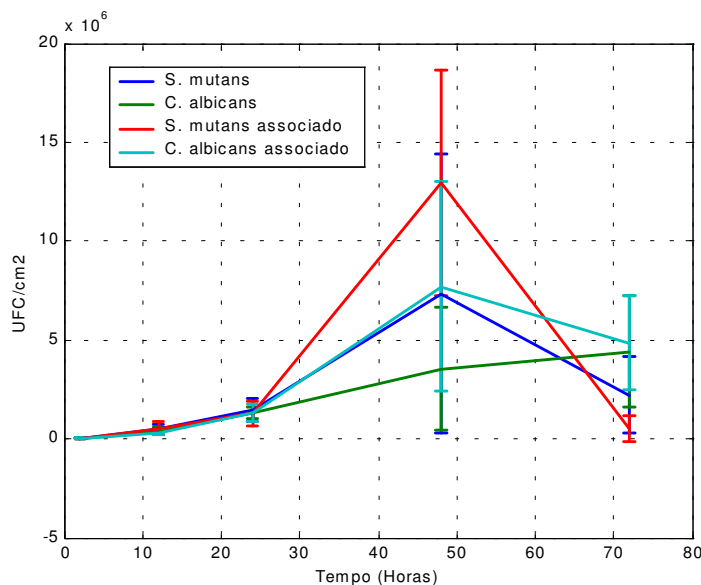
Percebeu-se que quando associada ao *S. mutans*, *C. albicans* mostrou grande aumento médio de aderência, demonstrando também ser beneficiada nesta relação. Observou-se que houve uniformidade no padrão de aderência até 48 horas, exceção para a amostra M4a+C4a.

Comparando a aderência de *C. albicans* isoladamente (Figura 11) e associada ao *S. mutans* em 72 horas (Figura 13), observou-se que durante a associação houve um certo direcionamento da aderência, sugerindo que o metabolismo de *S. mutans* pareceu exercer influência no padrão de aderência de *C. albicans* associada.

### 5.3.5 Avaliação dos Limites de Aderência de Todos os Grupos

A Figura 14 representa os limites de aderência para os grupos *S. mutans*, *C. albicans* e os dois associados. As curvas contêm os valores médios e as barras correspondentes são os limites inferiores e superiores, ou seja, os valores médios acrescentados e subtraídos dos desvios padrões. Os dados numéricos estão apresentados nas Tabelas A2 a A5 do Apêndice2.

FIGURA 14 - COMPORTAMENTO MÉDIO DE ADERÊNCIA EM UFC/cm<sup>2</sup> DOS GRUPOS AVALIADOS.



Para o período compreendido entre 2 e 24 horas, os comportamentos dos diferentes grupos são similares. Verificou-se que *S. mutans* apresentou valores médios superiores até o tempo de 24 horas quando cultivado isoladamente.

Os valores médios de aderência de *C. albicans* associada ao *S. mutans*, são superiores aos valores encontrados para ela isoladamente, com exceção da análise de aderência no tempo de 12 horas.

Foi observada grande variação nos valores de aderência para o período de 48 horas. Neste caso, a aderência dos microrganismos associados é bem superior em comparação a eles cultivados isoladamente, fato observado também durante o cultivo dos dentes nessas condições (Figuras 5 e 6).

Em 72 horas também ocorreram grandes desvios, porém, menores do que os apresentados em 48 horas. Em 72 horas, o grupo *C. albicans* cultivado isoladamente apresentou comportamento diferente dos demais, ou seja, continuou aumentando o valor da aderência.

Nas associações entre os dois microrganismos foi observado benefício (aumento de aderência) para ambos, porém *S. mutans* pareceu ser o mais favorecido nesta associação, principalmente no período de 48 horas. Esses dados confirmam os achados por meio de M. E. V. quando os dentes foram cultivados

com os microrganismos associados (Figura 9).

As Tabelas A6 a A9 do Apêndice 3 apresentam as análises estatísticas dos dados. Com o objetivo de identificar a significância estatística das diferentes comparações foi realizada uma análise global dos dados pelo método ANOVA, incluindo todas as variáveis. Foram observadas diferenças significativas para os efeitos da interação de tratamentos vs tempo e entre os tempos (Tabela A6).

De acordo com a análise estatística verificou-se que a aderência de *S.mutans* cultivado na presença de *C. albicans*, quando comparada à de *S.mutans* isoladamente foi significativa ( $p=0,0279$ ), dentro do limite de confiança de 95% ( $p=0,05$ ) no período de 48 horas de cultivo, (Tabelas A8 e A9). Com relação aos outros períodos, os valores observados não foram estatisticamente significantes (Tabelas A8 e A9). Portanto, o período de 48h foi considerado o ideal para avaliações desta natureza.

Na maioria dos tempos de cultivo avaliados foi observado um coeficiente de variação maior para *S. mutans*, provavelmente devido às diferenças no padrão de aderência entre os isolados (Tabelas A2 a A5).

Quanto ao padrão de aderência de *C.albicans*, não foi verificado diferença significativa entre o cultivo isolado e associado nos diferentes períodos analisados (Figura 14). Somente para o tempo de 48 horas (Tabela A9), houve diferença estatística entre a aderência de *C.albicans* cultivada sozinha e associada ( $p=0,0969$ ). Este resultado, embora fora do limite de confiança estabelecido, reforça a tendência de aumento de aderência de *C. albicans* quando associada ao *S. mutans*, encontrada na avaliação da aderência na superfície dentária, por meio de M.E.V. (Figura 9).

De acordo com estes resultados, *C. albicans* parece exercer um papel facilitador na colonização de *S. mutans* no meio bucal, o que implica ser este um importante fator relacionado ao aumento do risco à cárie, fato já sugerido por MOALIC et al. (2001).

Convém ressaltar que estudos “in vitro” podem auxiliar no entendimento dessas associações, porém o dinamismo deste mecanismo no meio bucal, em somatória com outros microrganismos da microbiota, mecanismos imunológicos do hospedeiro e condições ambientais, especialmente a dieta e higiene bucal são

considerados fatores reguladores (MARCOTTE e LAVOIE, 1998; KOLENBRANDER, 2000).

Os mecanismos de interações microbianas no ambiente bucal geram diferentes conseqüências e portanto, investigações neste sentido podem fornecer dados importantes, especialmente com relação à prevenção de doenças bucais, como a cárie e doença periodontal, que já tiveram grande avanço no campo preventivo, mas que ainda acometem grande parte da população mundial.

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia utilizada e com os resultados obtidos concluiu-se que:

- Qualitativamente, a aderência “in vitro” tanto de *C. albicans* como de *S. mutans* na superfície dentária, foi mais expressiva quando os dois microrganismos foram cultivados associados do que isoladamente.
- Nas análises quantitativas, foi observado aumento de aderência para ambos os microrganismos quando associados, porém *S. mutans* pareceu ser o mais favorecido nesta associação, principalmente no período de 48 horas.
- A aderência de *S. mutans* foi intensificada pela presença de *C. albicans* e conseqüentemente, a maior concentração de *S. mutans* na placa bacteriana dental, associada a outros fatores, poderia refletir em aumento de risco à cárie.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALTONEN, A. S.; TENOVUO, J.; LEHTONEN, O. P.; SAKSALA, R. Maternal caries incidence and salivary close-contacts with children affect antibody levels to *Streptococcus mutans* in children. **Oral Microbiology and Immunology**, v.5, n.1, p.12-18, 1990.
- AKDENIZ, B. G.; KOPARAL, E.; SEN, B. H.; ATES, M.; DENIZCI, A. A. Prevalence of *Candida albicans* in oral cavities and root canals of children. **Journal of Dentistry for Children**, p.289-292, 2002.
- ALALUUSUA, S.; MATTÖ, J.; GRÖNROOS, L.; INNILA, S.; TORKKO, H.; ASIKAINEM, S.; JOUSIMIES-SOMER, H.; SAARELA, M. Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. **Archives of Oral Biology**, v.41, p.167-73, 1996.
- ALDSWORTH, T.G.; MACFARLANE, T.W. A novel "in vitro" model system to grow films of oral bacteria for study of human tooth root surface caries. **Journal of Applied Microbiology**. v.91 p.139-146. 2001.
- ARENDORF, T. M.; WALKER, D. M. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. **Archives of Oral Biology**, v.25, p.1-10, 1980.
- AZEVEDO, R.V.P.; NELSON FILHO, P.; ASSED, S.; ITO, I.Y. Streptococci of the *mutans* group: Isolation, Identification, and prevalence of species in the saliva of mother-child pairs. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**. v.12, n.1, São Paulo Jan./Mar. 1998.
- BEIGHTON, D.; LUDFORD, R.; CLARK., D .T. Use of CHROMagar Candida medium for isolation of yeasts from dental samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.3025-3027, 1995.
- BENJAMIN JR., D. K.; ROSS, K.; MCKINNEY JR., R. E.; BENJAMIN, D. K.; AUTEN, R.; FISHER, R. G. When to suspect fungal infection in neonates: a clinical comparison of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* fungemia with coagulase-negative staphylococcal bacteremia. **Pediatrics**, v.106, n.4, p.712-718, 2000.
- BENTLEY, R. W.; LEIGH, J. A.; COLLINS, M.D. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, n4, p.487-494, oct. 1991.
- BÖNECKER, M. J. S.; GUEDES PINTO, A. C.; WALTER, L. R. F. Prevalência, distribuição e grau de afecção de cárie dentária em crianças de 0 a 36 meses de idade. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v.51, n.6, p.335-340, 1997.

BOWDEN, G. U. W.; HAMILTON, I. R. Microbial ecology of the oral cavity. **Advances in Microbial Ecology**, v. 3, p. 135-217, 1979.

BRANTING, C.; SUND, M-L; LINDER L. E. The influence of *Streptococcus mutans* on adesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces *in vitro*. **Archives of Oral Biology**, v.34, p.347-353, 1989.

BRATTHALL, D. Caries, views and perspectives. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v.100, p.47-51, 1992.

CANNON, R. D.; HOLMES, A. R.; MASON, A. B.; MONK, B. C. Oral Candida: clearence, colonization or Candidiasis. **Journal of Dental Research**, v. 74, p. 1152-1161, 1995.

CANNON, R.D.; CHAFFIN, W.L. Oral colonization by *Candida albicans*. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.**, v.10, n.3, p.359-383, 1999.

CARLSSON, P.; OLSSON, B.; BRATTHALL, D. The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique. **Archives of Oral Biology**, v.30, p.265-268,1985.

CASTRO, A. M.; MOCHIDOME, F. I. et al. *Streptococcus mutans* na cavidade bucal de bebês e sua relação com a cárie dentária. **Revista do CRO-MG**, v.6, n.1, p.24-27, 2000.

CAULFIELD, P. W.; CUTTER, G.R.; DASANAYAKE, A. P. Inicial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **Journal of Dental Research**, v.72, n.1, p.37-45, 1993.

DE SOET, J.J.; VAN LOVEREN, C.; LAMMENS, A.J.; PAVICIC, M.J.A.M.P.; HOMBURG, C.H.E.; TEN CATE, J.M.; DE GRAAFF, J. Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. **Caries Research**, v.25,n.2, p.116-122, 1991.

DUCHIN, S.; VAN HOUTE, J. Colonization of teeth in humans by *Streptococcus mutans* as related to its concentration in saliva and host age. **Infection and Immunity**, v.20, p.120-125, 1978.

EICK, S., GLOCKMANN. E., BRANDL. B., PFISTER. W. Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continous flow system. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 31, p. 278-285, 2004.

FLAITZ, C. M., HICKS, M. J. Oral candidiasis in children with immune suppression: clinical appearance and therapeutic considerations. **Journal of Dentistry for Children**, p. 161-166, 1999.

FRAIZ, F. C. **Estudo das características da utilização de açúcar através da mamadeira, do primeiro contato com açúcar e do padrão de aleitamento em crianças de 0 a 36 meses, Curitiba.** São Paulo, 1993. 76 f. Dissertação de mestrado. Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

FRAIZ, F. C.; WALTER, L. R. Study of the factors associated with dental caries in children who receive early dental care. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 15, n. 3, 2001.

FRANSEN, E.V.; PEDRAZZOLI, V.; KILIAN, M. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 6, n. 3, p. 129–133. jun. 1991.

GAINES, S.; JAMES, T.C.; FOLAN, M.; BAIRD, A. W.; O'FARRELLY, C. O. A novel spectrofluorometric microassay for *Streptococcus mutans* adherence to hydroxylapatite. **Journal of Microbiological Methods** (in press), 2003.

GIBBONS, R. J. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. **Journal of Dental Research**, v.63, p. 378-385, 1984.

GIBBONS, R. J.; NYGAARD, M. Synthesis of insoluble dextran its significance in formation of gelatinous deposits by plaque forming streptococci. **Archives of Oral Biology**, v.13, n.10, p. 1249-1262, Oct.1968.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, v.18, n.11, p.1357-1364, nov. 1973.

GREGORY, R. L.; KINDLE, J. C.; HOBBS, L. C.; FILLER, S. J. MALMSTROM, H. S. Function of anti-*Streptococcus mutans* antibodies: inhibition of virulence factors and enzyme neutralization. **Oral Microbiology and Immunology**, v.5, p.181-188, 1990.

GRÖNROOS, L. **Quantitative and Qualitative Characterization of Mutans Streptococci in Saliva and in the Dentition**. Helsinki, 2000. 80 f. Dissertação Acadêmica. Department of Pedodontics and Orthodontics, Institute of Dentistry, University of Helsinki and Department of Oral and Maxillofacial Diseases, Helsinki University Central Hospital.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiological Reviews**, v. 44, p. 331-384, 1980.

HANNULA, J. **Clonal types of oral yeasts in relation to age, health and geography**. Helsinki, 2000. Academic dissertation. Faculty of Medicine of the University of Helsinki.

HARRINGTON, D.J., RUSSELL, R. R. Identification and characterisation of two extracellular proteases of *Streptococcus mutans* . **FEMS Microbiology Letters**, v. 121, p. 237-241, 1994.

HINKELMANN, K.; KEMPTHORNE, O. **Design and analysis of experiments**. Vol. I: Introduction to Experimental Design. John Wiley & Sons, 1994.

HOMER, K. A., WHILEY, R. A., BEIGHTON, D. Proteolytic activity of oral streptococci. **FEMS Microbiology Letters**, v. 55, p. 257-260, 1990.

JACKSON, R. J., LIM, D. V., DAO, M. L. Identification and analysis of a collagenolytic activity in *Streptococcus mutans*. **Current Microbiology**, v. 34, p. 49-54, 1997.

JORGE, A. O. C.; KOGA-ITO, C.Y.; GONÇALVES, C.R.; FANTINATO, V.; UNTERKIRCHER C.S. Presence of *Candida* genus yeasts in saliva of patients with different predisposing factors and of control individuals. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v.11, n.4, p.279-285, out/dez.1997.

JORGE, A. O. C. **Microbiologia bucal**, 2<sup>a</sup> ed., São Paulo: Livraria Editora Santos, 1998.

KELLOGG, J. A.; BANKERT, D. A.; CHATURVEDI, V. Limitations of the current microbial identification system for identification of clinical yeast isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.5, p.1197-1200, may. 1998.

KLEIN, M. I., FLÓRIO F. M., PEREIRA, A. C., HÖFLING, J. F.; GONÇALVES, R. B. Longitudinal Study of Transmission, Diversity, and Stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* Genotypes in Brazilian Nursery Children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n.10, p. 4620–4626, October. 2004.

KOGA-ITO, C. Y., UNTERKIRCHER, C. S., WATANABE, H., MARTINS, C. A. P., VIDOTTO, V., JORGE, A. O. C. Caries risk tests and salivary levels of immunoglobulins to *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in mouthbreathing syndrome patients. **Caries Research**, v. 37, p. 38-43, 2003.

KÖHLER, B.; BIRKHED, D.; OLSSON, S. Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. **Caries Research**, v.29, n.5, p.402-406, 1995.

KÖHLER, B; BRATTHALL, D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. **Journal of Clinical Microbiology**, v.9, p.584-588, 1979.

KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions and genetic systems. **Annual Review of Microbiology**, v.54, p.413-37, 2000.

KOLENBRANDER, P. E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.11, p.3247-3252, 1993.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. **Diagnóstico microbiológico- 5<sup>a</sup> ed.** MEDSI-Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro-RJ, 2001. 1465 p.

KREULEN, C. M.; DE SOET, H. J.; HOGVEEN, R.; WEERKAMP, J. S. *Streptococcus mutans* in children using nursing bottles. **ASDC Journal of Dentistry for Children**, v.64, p.107-111, 1997.

KUHN, D. M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infection and Immunity**, v.70, n.2, p.878-888, 2002.

KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; CLARK, T. A.; PUJO, C.; CHANDRA, J.; HAJJEH, R. A.; WARNOCK, D. W.; SOLL, D. R.; GHANNOUM, M. A. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, n.6, p.1074-1081, 2004.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F.; KITAJIMA, E. W.; ISHIDA, M. L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 9, p.1-41, 2001.

LI, F., MICHALECK, S. M., DASANAYAKE, A. P., LI, Y., KIRK, K., CHILDERS, N. K. Intranasal immunization of humans with *Streptococcus mutans* antigens. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, p. 271-277, 2003.

LI, Y.; CAULFIELD, P. W. The fidelity of initial acquisition of *mutans streptococci* by infants from their mothers. **Journal of Dental Research**, v.74, p.681-685, 1995.

LINDQUIST, B. **Mutans streptococci in human dentition**. Thesis, Göteborg: University of Göteborg, 1991.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiological Reviews**, v.50, p.353-380, 1986.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.71-109, 1998.

MATTOS GRANER, R. O., **Relação entre os níveis bucais de estreptococos do grupo mutans, alguns de seus fatores de virulência e a incidência de cárie dental em crianças de 12 a 30 meses de idade**. São Paulo, 1999. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo.

MATTOS-GRANER R.O., SMITH D. J., KING WF, MAYER MP. Water-insoluble glucan synthesis by *mutans streptococcal* strains correlates with caries incidence in 12 to 30-months-old children. **Journal of Dental Research**, v.79, p.1371-1377, 2000.

MATTOS-GRANER, R. O., JIN, S., KING, W. F., CHEN, T., SMITH, D. J., DUNCAN, M. S. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene end coding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. **Infection and Immunity**, v. 69, p.6931-6941, 2001.

MOALIC, E.; GESTALIN, A.; QUINIO, D.; GEST, P.E. ZERILI, A; LE FLOHIC, A.M. The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. **Caries Research**. v.35 p.149-155. 2001.

MONTANARO, L.; CAMPOCCIA, D.; RIZZI, S.; DONATI, M. E.; BRESCHI, L.; PRATI, C.; ARCIOLA, C. R. Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. **Biomaterials**, v.25, p.4457-4463, 2004.

MOREIRA, D.; SPOLIDÓRIO, D. M. P.; RODRIGUES, J. A. O.; BORIOLLO, M. F. G.; PEREIRA, C. V.; ROSA, E. A. R.; HÖFLING, J. F. Biotipos de *Candida spp.* na cavidade oral de escolares de diferentes categorias socioeconômicas de Piracicaba-SP, Brasil. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.15, n.3, p.187-195, 2001.

NAPIMOGA, M. H. **Avaliação do padrão de clonalidade e virulência de *S. mutans* isolados de indivíduos livres de cárie e cárie-ativos.** Dissertação (Mestrado) –Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Piracicaba, SP : 2004. 62f.

NIKAWA, H.; EGUSA, H.; MAKIHIRA, S.; YAMASHIRO, H.; FUKUSHIMA, H.; JIN, C.; NISHIMURA, M.; PUDJI, R. R.; HAMADA, T. Alteration of the coadherence of *Candida albicans* with oral bacteria by dietary sugar. **Oral Microbiology and Immunology**, v.16, p.279-283, 2001.

NIKAWA, H.; HAMADA, T.; YAMASHIRO, H.; MURATA, H.; SUBIWAHJUDI, A. The effect of saliva or serum on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* colonization of hydroxyapatite beads. **Journal of Dentistry**, v.26, n.1. p.31-37, 1998.

NIKAWA, H.; YAMASHIRO, H.; MAKIHIRA, S.; NISHIMURA, M.; EGUSA, H.; FURUKAWA, M.; SETIJANTO, D. *In vitro* cariogenic potential of *Candida albicans*. **Mycoses**, v.46, p.471-478, 2003.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v.54, p.49-79, 2000.

PELINO, J. E. P. **Estudo in vitro do efeito do laser de Nd: YAG sobre o esmalte dental humano: Análise por Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita. São José dos Campos-SP, 1998. 155p.

PETTI, S. Salivary distribution of *Streptococcus mutans* in schoolchildren from Rome (Italy). **European Journal of Epidemiology**, v.13, n.1, p. 113-115, 1997.

PETTI, S.; HAUSEN, H. W. Caries prediction by multiple salivary mutans streptococcal counts in caries-free children with different levels of fluoride exposure, oral hygiene and sucrose intake. **Caries Research**, v.34, p.380-387. 2000.

PINCUS, D. H.; COLEMAN, D. C.; PRUITT, W. R.; PADHYE, A. A.; SALKIN, I. F.; GEIMER, M.; BASSEL, A.; SULLIVAN, D. J.; CLARKE, M.; HEARN, V. Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.11, p.3533-3539, nov, 1999.

PIRES, M. F. C.; CORRÊA, B.; GAMBALE, W.; RODRIGUES, P. Experimental model of *Candida albicans* (serotypes A and B) adherence in vitro. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.163-169, 2001.

RADFORD, D.R.; CHALACOMBE, S.J.; WALTER, J. D. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.10, n.1, p.99-116, 1999.

REGO, M.A.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A. O.C. Effects of oral environment stabilization procedures on counts of *Candida* spp. In children. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.17, n.4, p.332-336, 2003.

ROSS, I. K.; DE BERNARDIS, F.; EMERSON G. W.; CASSONE A.; SULLIVAN, P.A. The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of a proteinase-deficient mutant. **Journal of General Microbiology**, v.136, p.687- 694, 1990.

SAMARANAYAKE, L. P.; HUGHES, A.; WEETMAN, D. A.; MACFARLANE, T. W. Growth and acid production of *Candida* species in human saliva supplemented with glucose. **Journal of Oral Pathology**, v.15, p.251-254, 1986.

SEN, B. H.; SAFAVI, K. E.; SAPANGBERG, L. S. W. Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v.84, p.68-73, 1997.

SILVA, C. L. P.; SANTOS, R. M. R.; COLOMBO, A. L. Cluster of *Candida parapsilosis* primary bloodstream infection in a neonatal intensive care unit. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.5, n.1, p.32-36, 2001.

SOLL, D. R. *Candida* commensalisms and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. **Acta Tropica**. v.81, p.101-110 .2002.

TENOVUO, J. Antimicrobial function of human saliva - how important is it for oral health? **Acta Odontologic Scandinavian**, v.56, p.250-256, 1998.

UETA, E.; TANIDA, T.; DOI, S.; OSAKI, T. Regulation of *Candida albicans* growth and adhesion by saliva. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**., p.66-73, 2000.

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. **Journal of Dental Research**, v.75,n. 4, p.1008-1014, 1996.

YAZAKI, S. C.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C.; UNTERKIRCHER, C. S. IgA anti-*Streptococcus mutans* em crianças com e sem cárie dentária. **Revista Odontológica da Universidade de São Paulo**, v.13, n.3, p.211-217, 1999.

YOSHIYASU, R. Y. A. **Um estudo *in vitro* sobre os efeitos da irradiação pelo laser de Er: YAG combinado com a terapia com flúor na resistência ácida do esmalte de dentes submetidos a aparelho ortodôntico fixo.** São Paulo, 2001. 69 f. Dissertação de mestrado. IPEN. Universidade de São Paulo.



## **APÊNDICES**

**APÊNDICE 1**  
**TABELA COM AS AVALIAÇÕES QUALITATIVAS DOS TESTES DE ADERÊNCIA**

TABELA A1- AVALIAÇÕES QUALITATIVAS DOS TESTES DE ADERÊNCIA

AMOSTRAS	CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS DURANTE OS DIAS DE INCUBAÇÃO																																							
	GRUMOS					BIOFILME/COROA					BIOFILME/RAIZ					PRECIPITADO/FUNDO																								
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20										
M1	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	3	3	4	4	4	1	1	1	1	2	2	3	4	4	4	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2
C1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	3	3	3	2	3	3	3
M1+C1	1	1	2	2	3	3	4	5	5	5	1	2	2	3	3	4	4	5	5	5	1	1	2	2	3	3	4	5	5	5	0	0	0	1	1	1	2	2	2	2
M2	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2	3	3	3	3	3	1	1	2	2	3	3	3	3	3	3	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2
C2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	3	3	4	5	5	5	
M2+C2	0	1	1	1	2	2	2	3	3	3	1	2	3	3	3	4	4	4	4	4	1	2	3	3	4	4	4	4	4	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	
M3	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	3	3	3	3	1	1	2	2	3	3	3	3	3	3	0	0	1	1	2	2	2	2	2	2	
C3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	3	3	4	4	4	4	4	
M3+C3	0	1	1	1	2	2	2	3	3	3	1	3	3	3	3	3	4	4	4	4	1	2	3	3	4	4	4	4	4	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	
M4	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	3	3	3	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	
C4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	2	3	3	4	4	4	4	
M4+C4	1	1	2	2	3	4	4	5	5	5	1	2	3	3	3	3	3	5	5	5	1	2	3	3	3	3	4	5	5	5	0	0	0	1	1	2	2	2	2	2
M5	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	3	3	3	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	0	0	1	2	2	2	2	2	2	2	
C5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	3	3	4	4	4	4	
M5+C5	1	1	1	2	2	3	3	4	4	4	1	2	2	3	3	3	3	4	4	4	1	2	2	3	3	3	3	4	4	4	0	0	1	1	2	2	2	2	2	2
M6	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	3	3	3	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	
C6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	3	3	3	4	4	4	4	
M6+C6	0	1	1	2	2	3	3	4	4	4	1	2	2	3	3	3	4	4	4	1	2	2	3	3	3	4	4	4	4	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	
M7	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	3	3	3	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	
C7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	4	4	4	5	5	5	5	
M7+C7	1	1	1	2	2	3	3	4	4	4	1	2	2	3	3	3	3	4	4	4	1	2	2	3	3	3	3	4	4	4	1	1	2	2	3	2	3	3	3	3
M	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	3	3	3	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	3	3	4	4	5	5	5	5	
M+C	1	1	1	1	2	2	3	3	3	3	1	2	3	3	3	3	4	4	4	4	1	2	3	3	3	3	4	4	4	4	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2

Os números 0 a 5 se referem à intensidade da característica observada macroscopicamente durante os dias de incubação.

**APÊNDICE 2**

**TABELAS DAS CONTAGENS DOS TESTES QUANTITATIVOS DE**

**ADERÊNCIA**

TABELA A2 – CONTAGEM ESTIMADA DA ADERÊNCIA DE *S. mutans* EM UFC/cm<sup>2</sup>

amostra	Tempo de cultivo				
	2 horas	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas
M2a	0.0865 x10 <sup>5</sup>	4.4278 x10 <sup>5</sup>	1.0789 x10 <sup>6</sup>	0.3563 x10 <sup>7</sup>	0.5598 x10 <sup>6</sup>
M2b	0.0713 x10 <sup>5</sup>	4.9367 x10 <sup>5</sup>	1.5115 x10 <sup>6</sup>	0.1679 x10 <sup>7</sup>	0.4580 x10 <sup>6</sup>
M1a	0.0967 x10 <sup>5</sup>	6.4126 x10 <sup>5</sup>	1.7864 x10 <sup>6</sup>	0.8703 x10 <sup>7</sup>	1.3741 x10 <sup>6</sup>
M1b	0.0713 x10 <sup>5</sup>	7.7868 x10 <sup>5</sup>	1.3334 x10 <sup>6</sup>	0.2646 x10 <sup>7</sup>	0.6107 x10 <sup>6</sup>
M7a	0.0407 x10 <sup>5</sup>	3.1554 x10 <sup>5</sup>	1.5115 x10 <sup>6</sup>	0.8245 x10 <sup>7</sup>	3.4608 x10 <sup>6</sup>
M7b	0.0662 x10 <sup>5</sup>	3.6135 x10 <sup>5</sup>	1.0535 x10 <sup>6</sup>	0.2545 x10 <sup>7</sup>	2.0358 x10 <sup>6</sup>
M4a	1.1095 x10 <sup>5</sup>	5.1912 x10 <sup>5</sup>	2.4734 x10 <sup>6</sup>	2.4734 x10 <sup>7</sup>	3.5626 x10 <sup>6</sup>
M4b	1.5115 x10 <sup>5</sup>	7.8376 x10 <sup>5</sup>	2.3818 x10 <sup>6</sup>	1.1451 x10 <sup>7</sup>	5.4965 x10 <sup>6</sup>
Ma	0.1629 x10 <sup>5</sup>	5.7001 x10 <sup>5</sup>	0.9619 x10 <sup>6</sup>	0.1781 x10 <sup>7</sup>	0
Mb	0.0509 x10 <sup>5</sup>	6.4635 x10 <sup>5</sup>	0.6972 x10 <sup>6</sup>	0.8092 x10 <sup>7</sup>	4.6313 x10 <sup>6</sup>
Valor médio	3.2674 x10 <sup>4</sup>	5.5525 x10 <sup>5</sup>	1.4790 x10 <sup>6</sup>	7.3440 x10 <sup>6</sup>	2.2190 x10 <sup>6</sup>
Desvio padrão	5.2813 x10 <sup>4</sup>	1.6016 x10 <sup>5</sup>	5.9080 x10 <sup>5</sup>	7.0312 x10 <sup>6</sup>	1.9442 x10 <sup>6</sup>

M = *S. mutans*. Os números 2, 1, 7 e 4 ao lado da letra M, indicam os diferentes isolados. As letras a e b em cada amostra indicam a realização do experimento em duplicatas. As linhas de referência não apresentam números ao lado da letra.

TABELA A3 – CONTAGEM ESTIMADA DA ADERÊNCIA DE *C. albicans* EM UFC/cm<sup>2</sup>

amostra	Tempo de cultivo				
	2 horas	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas
C2a	7.5323 x10 <sup>4</sup>	3.4099 x10 <sup>5</sup>	1.1451 x10 <sup>6</sup>	1.9340 x10 <sup>6</sup>	9.1609 x10 <sup>6</sup>
C2b	8.2448 x10 <sup>4</sup>	4.2242 x10 <sup>5</sup>	1.2367 x10 <sup>6</sup>	0.9161 x10 <sup>6</sup>	6.4126 x10 <sup>6</sup>
C1a	1.2723 x10 <sup>4</sup>	2.2902 x10 <sup>5</sup>	1.1451 x10 <sup>6</sup>	2.6974 x10 <sup>6</sup>	2.1375 x10 <sup>6</sup>
C1b	3.7661 x10 <sup>4</sup>	6.2090 x10 <sup>5</sup>	1.9238 x10 <sup>6</sup>	2.0358 x10 <sup>6</sup>	0.7634 x10 <sup>6</sup>
C7a	4.6313 x10 <sup>4</sup>	2.2902 x10 <sup>5</sup>	1.2367 x10 <sup>6</sup>	8.2448 x10 <sup>6</sup>	5.9546 x10 <sup>6</sup>
C7b	2.6974 x10 <sup>4</sup>	2.4938 x10 <sup>5</sup>	1.0077 x10 <sup>6</sup>	7.7868 x10 <sup>6</sup>	5.3438 x10 <sup>6</sup>
C4a	0.4072 x10 <sup>4</sup>	2.0358 x10 <sup>5</sup>	1.7864 x10 <sup>6</sup>	0.9161 x10 <sup>6</sup>	1.7304 x10 <sup>6</sup>
C4b	0.5598 x10 <sup>4</sup>	3.5117 x10 <sup>5</sup>	1.6032 x10 <sup>6</sup>	0.7125 x10 <sup>6</sup>	2.3920 x10 <sup>6</sup>
Ca	1.9340 x10 <sup>4</sup>	5.8019 x10 <sup>5</sup>	1.0789 x10 <sup>6</sup>	2.2393 x10 <sup>6</sup>	2.9009 x10 <sup>6</sup>
Cb	3.3590 x10 <sup>4</sup>	7.5832 x10 <sup>5</sup>	1.1451 x10 <sup>6</sup>	7.7868 x10 <sup>6</sup>	7.3287 x10 <sup>6</sup>
Valor médio	3.4404 x10 <sup>4</sup>	3.9850 x10 <sup>5</sup>	1.3309 x10 <sup>6</sup>	3.5269 x10 <sup>6</sup>	4.4125 x10 <sup>6</sup>
Desvio padrão	2.7157 x10 <sup>4</sup>	1.9314 x10 <sup>5</sup>	3.2013 x10 <sup>5</sup>	3.1129 x10 <sup>6</sup>	2.7958 x10 <sup>6</sup>

C = *C. albicans*. Os números 2, 1, 7 e 4 ao lado da letra C, indicam os diferentes isolados. As letras a e b em cada amostra indicam a realização do experimento em duplicatas. As linhas de referência não apresentam números ao lado da letra.

TABELA A4 - CONTAGEM ESTIMADA DA ADERÊNCIA DE *S. mutans* ASSOCIADO A *C. albicans* EM UFC/cm<sup>2</sup>

amostra	Tempo de cultivo				
	2 horas	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas
M2a+C2a	0.0763 x10 <sup>5</sup>	0.6107 x10 <sup>6</sup>	1.2367 x10 <sup>6</sup>	1.1451 x10 <sup>7</sup>	0
M2b+C2b	0.1272 x10 <sup>5</sup>	0.6871 x10 <sup>6</sup>	1.0077 x10 <sup>6</sup>	0.5955 x10 <sup>7</sup>	0
M1a+C1a	0.0254x10 <sup>5</sup>	1.2469 x10 <sup>6</sup>	1.7864 x10 <sup>6</sup>	2.1986 x10 <sup>7</sup>	1.4250 x10 <sup>6</sup>
M1b+C1b	0.0509 x10 <sup>5</sup>	0.7787 x10 <sup>6</sup>	1.4657 x10 <sup>6</sup>	1.2825 x10 <sup>7</sup>	1.4250 x10 <sup>6</sup>
M7a+C7a	0.0102 x10 <sup>5</sup>	0.1018 x10 <sup>6</sup>	0.3206 x10 <sup>6</sup>	1.2367 x10 <sup>7</sup>	0.1018 x10 <sup>6</sup>
M7b+C7b	0.0153 x10 <sup>5</sup>	0.0611 x10 <sup>6</sup>	0.5955 x10 <sup>6</sup>	1.5574 x10 <sup>7</sup>	0.1527 x10 <sup>6</sup>
M4a+C4a	0.8194 x10 <sup>5</sup>	0.3410 x10 <sup>6</sup>	2.3360 x10 <sup>6</sup>	1.6032 x10 <sup>7</sup>	0
M4b+C4b	1.3283 x10 <sup>5</sup>	0.6820 x10 <sup>6</sup>	2.0154 x10 <sup>6</sup>	2.0612 x10 <sup>7</sup>	1.5777 x10 <sup>6</sup>
Ma+Ca	0.1578 x10 <sup>5</sup>	0.4173 x10 <sup>6</sup>	0.8703 x10 <sup>6</sup>	0.6769 x10 <sup>7</sup>	0.6107 x10 <sup>6</sup>
Mb+Cb	0.0763 x10 <sup>5</sup>	0.5955 x10 <sup>6</sup>	1.3283 x10 <sup>6</sup>	0.5955 x10 <sup>7</sup>	0
Valor médio	2.6872 x10 <sup>4</sup>	5.5220 x10 <sup>5</sup>	1.2963 x10 <sup>6</sup>	1.2952 x10 <sup>7</sup>	5.2930 x10 <sup>5</sup>
Desvio padrão	4.4348 x10 <sup>4</sup>	3.4659 x10 <sup>5</sup>	6.3065 x10 <sup>5</sup>	5.7292 x10 <sup>6</sup>	6.7952 x10 <sup>5</sup>

M = *S. mutans*. C = *C. albicans*. + indica associação. Os números 2, 1, 7 e 4 ao lado das letras M e C, indicam os diferentes isolados. As letras a e b em cada amostra indicam a realização do experimento em duplicatas. As linhas de referência não apresentam número ao lado da letra.

TABELA A5 - CONTAGEM ESTIMADA DA ADERÊNCIA DE *C. albicans* ASSOCIADA A *S. mutans* EM UFC/cm<sup>2</sup>

amostra	Tempo de cultivo				
	2 horas	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas
M2a+C2a	4.1224 x10 <sup>4</sup>	3.3081 x10 <sup>5</sup>	0.9619 x10 <sup>6</sup>	0.3664 x10 <sup>7</sup>	7.3287 x10 <sup>6</sup>
M2b+C2b	3.0027 x10 <sup>4</sup>	2.1375 x10 <sup>5</sup>	1.2825 x10 <sup>6</sup>	0.4530 x10 <sup>7</sup>	4.6822 x10 <sup>6</sup>
M1a+C1a	3.5117 x10 <sup>4</sup>	1.7304 x10 <sup>5</sup>	1.6490 x10 <sup>6</sup>	1.9238 x10 <sup>7</sup>	5.4965 x10 <sup>6</sup>
M1b+C1b	3.3590 x10 <sup>4</sup>	2.5447 x10 <sup>5</sup>	1.9696 x10 <sup>6</sup>	1.0789 x10 <sup>7</sup>	6.7180 x10 <sup>6</sup>
M7a+C7a	2.8501 x10 <sup>4</sup>	2.7483 x10 <sup>5</sup>	0.9212 x10 <sup>6</sup>	0.4122 x10 <sup>7</sup>	2.4938 x10 <sup>6</sup>
M7b+C7b	3.2063 x10 <sup>4</sup>	2.9518 x10 <sup>5</sup>	1.1451 x10 <sup>6</sup>	0.5497 x10 <sup>7</sup>	4.3260 x10 <sup>6</sup>
M4a+C4a	5.1912 x10 <sup>4</sup>	2.7483 x10 <sup>5</sup>	2.1528 x10 <sup>6</sup>	0.0407 x10 <sup>7</sup>	0.6107 x10 <sup>6</sup>
M4b+C4b	3.0027 x10 <sup>4</sup>	4.0206 x10 <sup>5</sup>	1.3741 x10 <sup>6</sup>	0.8703 x10 <sup>7</sup>	2.4429 x10 <sup>6</sup>
Ma+Ca	1.4250 x10 <sup>4</sup>	3.2063 x10 <sup>5</sup>	1.0077 x10 <sup>6</sup>	1.0993 x10 <sup>7</sup>	7.0742 x10 <sup>6</sup>
Mb+Cb	4.9876 x10 <sup>4</sup>	3.6644 x10 <sup>5</sup>	1.0077 x10 <sup>6</sup>	0.9161 x10 <sup>7</sup>	7.4814 x10 <sup>6</sup>
Valor médio	3.4659 x10 <sup>4</sup>	2.9060 x10 <sup>5</sup>	1.3472 x10 <sup>6</sup>	7.7104 x10 <sup>6</sup>	4.8654 x10 <sup>6</sup>
Desvio padrão	1.0943 x10 <sup>4</sup>	6.8511 x10 <sup>4</sup>	4.3890 x10 <sup>5</sup>	5.3107 x10 <sup>6</sup>	2.3931 x10 <sup>6</sup>

M = *S. mutans*. C = *C. albicans*. + indica associação. Os números 2, 1, 7 e 4 ao lado das letras M e C, indicam os diferentes isolados. As letras a e b em cada amostra indicam a realização do experimento em duplicatas. As linhas de referência não apresentam número ao lado da letra.

### **APÊNDICE 3**

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TESTES QUANTITATIVOS DE ADERÊNCIA**

TABELA A6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA ADERÊNCIA DOS MICRORGANISMOS EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO

Fonte	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor F	Pr>F	Significância
Tratamento*	3	1.3072202E13	1.88	0.1344	não
Tempo	4	4.0819452E14	58.73	<.0001	sim
Tratamento*tempo	12	4.446824E13	6.40	<.0001	sim

\* C = *C. albicans* ; C+M = *C. albicans* associada; M = *S. mutans*; M+C = *S. mutans* associado

TABELA A7 – PARÂMETROS UTILIZADOS PARA TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Classe	Quantidade	Categorias			
		C	C+M	M	M+C
Tratamento	4				
Tempo (horas)	5	2	12	24	48 72

C = *C. albicans* ; C+M = *C. albicans* associada; M = *S. mutans*; M+C = *S. mutans* associado

TABELA A8 – CONTRASTES ORTOGONAIS DO TESTE F (TEMPOS DE 2 A 72 HORAS)

Tempo(horas)	Agrupamento	Média (unidade)	N	Tratamento
2	A	34660	10	C+M
	A	34397	10	C
	A	32666	10	M
	A	26884	10	M+C
12	A	555300	10	M
	A	552510	10	M+C
	B A	398400	10	C
	B	290600	10	C+M
24	A	1477900	10	M
	A	1347300	10	C+M
	A	1333000	10	C
	A	1298600	10	M+C
48	A	12957000	10	M+C
	B A	7707700	10	C+M
	B A	7344000	10	M
	B	3527500	10	C
72	A	4865100	10	C+M
	B A	4411300	10	C
	B C	2218900	10	M
	C	530600	10	M+C



TABELA A9 – CONTRASTES ORTOGONAIS DO TESTE F - LIMITE DE CONFIANÇA DE 95% (p=0,05)

Tempo (horas)	Contraste	Graus de liberdade	Média Quadrática	Valor F	Pr > F	Significância
2	C vs C+M	1	345845.0	0.00	0.9876	Não
	M vs M+C	1	167157620.0	0.12	0.7320	Não
12	C vs C+M	1	58104200000	1.23	0.2738	Não
	M vs M+C	1	38920500	0.00	0.9772	Não
24	C vs C+M	1	1022450000	0.00	0.9504	Não
	M vs M+C	1	160742450000	0.62	0.4371	Não
48	C vs C+M	1	8.737036E13	2.91	0.0965	Não
	M vs M+C	1	1.5752885E14	5.25	0.0279	Sim
72	C vs C+M	1	1.0296722E12	0.23	0.6333	Não
	M vs M+C	1	1.4251784E13	3.20	0.0818	Não

C = *C. albicans* ; C+M = *C. albicans* associada; M = *S. mutans*; M+C = *S. mutans* associado

**APÊNDICE 4**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos realizando uma pesquisa em crianças cadastradas na Disciplina de Odontopediatria da UFPR, o objetivo desta pesquisa é estudar a ocorrência de coinfeção entre dois microrganismos presentes na microbiota bucal (*Streptococcus mutans* e *Candida albicans*) e avaliar o padrão de aderência destes na superfície dentária.

Não existem riscos ao paciente relacionados a esta pesquisa, que consiste apenas em coleta de saliva e placa bacteriana com um Swab (espécie de um cotonete). Não será realizado nenhum procedimento clínico em seu filho(a) relacionado a esta pesquisa.

O dentista responsável pela pesquisa, Dicler de Sant'Anna Vitor Barbieri poderá ser encontrada nos telefones 0xx41 263-2257/362-5410. Caso seja mais conveniente o Professor Fabian Calixto Fraiz está autorizado, como pesquisador, a prestar os esclarecimentos e pode ser encontrado no Curso de Odontologia da Universidade Federal do Paraná todas as 2as. e 3as. Feiras das 13:30 às 17:30.

Estão garantidas todas as informações que você queira, antes, durante e depois do estudo.

A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de não autorizar sua participação no estudo, ou se aceitar, retirar seu consentimento a qualquer momento. O tratamento executado na UFPR não esta condicionado a sua participação.

Os resultados serão divulgados em relatório, eventos e/ou publicações científicas, sendo isto feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

Nenhuma despesa necessária para a realização da pesquisa será de sua responsabilidade.

Pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.

Eu, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado(a) a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper a participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Assinatura do responsável

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Dicler de Sant'Anna Vitor Barbieri

**APÊNDICE 5**  
**TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES PERMANENTES**

**TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES PERMANENTES**

Eu, \_\_\_\_\_, RG n<sup>o</sup> \_\_\_\_\_, residente à  
\_\_\_\_\_ bairro \_\_\_\_\_,  
Cidade \_\_\_\_\_, UF \_\_\_\_\_ CEP \_\_\_\_\_, doo  
\_\_\_\_\_ dentes para sua utilização na pesquisa intitulada "*Ocorrência de coinfeção entre Streptococcus mutans e Candida albicans em crianças com alto risco à cárie e sua relação com a aderência na superfície coronária dental*" previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa e realizada pela pesquisadora Dicler de Sant'Anna Vitor Barbieri, mestranda do Programa de Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da UFPR. Declaro ainda que os dentes doados foram extraídos por indicação terapêutica cujos históricos fazem parte dos prontuários de quem se originam.

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Assinatura do doador ou responsável  
\_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Dicler de Sant'Anna Vitor Barbieri

**APÊNDICE 6**  
**FICHA DE ANAMNESE E EXAME CLÍNICO**

### Questionário de Anamnese:

1. Nome da criança: \_\_\_\_\_
2. Número do prontuário \_\_\_\_\_
3. Data de nascimento \_\_\_\_\_
4. Data do exame: \_\_\_\_\_
5. Nome da mãe ou responsável: \_\_\_\_\_
6. Está fazendo ou fez uso de algum medicamento na última semana? Qual? \_\_\_\_\_
7. Fez uso de algum enxaguatório bucal na última semana? Qual? \_\_\_\_\_

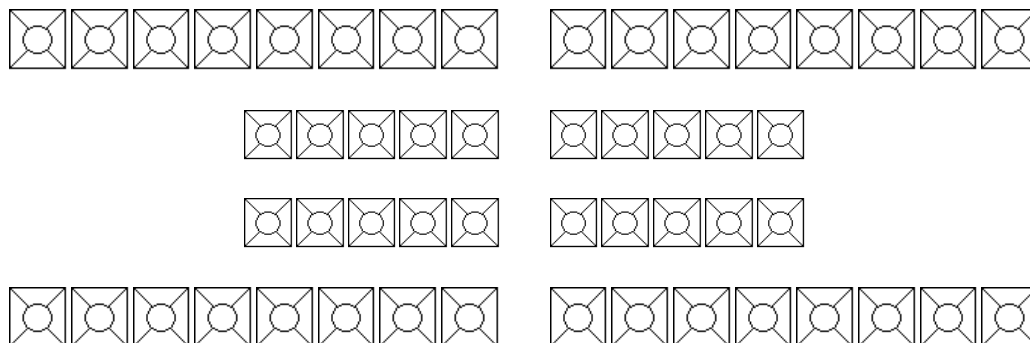
### Presença de Placa

52/12	51/11	61/21	62/22
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
82/42	81/41	71/31	72/32

#### Códigos

0 – Ausência de placa evidente  
1 - Presença de placa evidente

### Odontograma



#### Códigos

0 - dente ausente  
1 - dente presente  
2 - dente com lesão de cárie (restaurado ou não)  
3 - dente restaurado (sem lesão de cárie)

**APÊNDICE 7**  
**APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**



**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO SCS/UFPR**

**Projeto: 014SI.014-03-11**

**Tipo/ local: Ciências Biológicas / Odonto**

**Título: OCORRÊNCIA DE COINFEÇÃO ENTRE STREPTOCOCCUS MUTAUS E CANDIDA ALBICAUS EM CRIANÇAS COM ALTO RISCO À CÁRIE E SUA RELAÇÃO COM A ADERÊNCIA NA SUPERFÍCIE CORONÁRIA DENTAL.**

**Autor: DICLER DE SANT'ANA VITOR BARBIERI**

**RELATOR: IARA MARLI PEREIRA MACHADO**

**DATA ENTREGA AO CEP: 12-11-03 ENTREGA AO RELATOR: RELATOR DEV. CEP:**

**PARECER DO RELATOR:**

O presente projeto por mim avaliado e está em conformidade com a Resolução 196/96 do CNS. Entretanto a aprovação dependerá do atendimento aos itens pendentes, relacionados abaixo:

- 1) Esclarecimento quanto a vinculação e co-orientação do presente projeto. No termo de compromisso consta que o orientador é a professora Vera Tente, mas no projeto o orientador é o professor Fabiano C. Travi.
- 2) No termo de consentimento e doação de dentes deveria haver o consentimento do menor, juntamente com o responsável.
- 3) Esclarecer o destino que os microrganismos terão ao final do projeto, como estes serão manipulados e controlados durante o desenvolvimento do trabalho prático.
- 4) Esclarecimento com relação a doação de dentes permanentes de crianças de 0 a 6 anos.

10/12/03  
 APROVADO NÃO APROVADO *Iara M. P. Machado* Relator / assinatura e identificação Data: 24/09/03  
Prof. Iara M. P. Machado  
 Departamento de Farmácia - UFPR

**Parecer da Comissão** Aprovado não aprovado  
 Assinatura do presidente Encaminhar para: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_

Reapresentação e complementação do projeto: Em 19/02/2004

Todos os itens foram esclarecidos.  
19/02/04 *Iara M. P. Machado* Relator / assinatura e identificação Data: 19/02/04  
 x APROVADO NÃO APROVADO

Assinatura do presidente Encaminhar para: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_  
 CEP/HC-UFPR

Recebido em 30/03/04.  
 Dilerj. J. Bombom

**ANEXO**  
**ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO “CÁRIES RESEARCH”**

## **ANALYSIS OF THE ADHERENCE “IN VITRO” OF *Streptococcus mutans* and *Candida albicans***

D. S. V. Barbieri<sup>a,b</sup>

V. A. Vicente<sup>a</sup>

F. C. Fraiz<sup>b</sup>

T. I. E. Svidzinski<sup>c</sup>

Departamentos de <sup>a</sup>Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná,

<sup>b</sup>Estomatologia da Universidade Federal do Paraná, <sup>c</sup>Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá.

### **Key Words**

*Candida albicans*, coaggregation, microbial adherence, *Streptococcus mutans*.

Corresponding author:

Dicler de Sant’Anna Vitor Barbieri

Address: Rua Itupava 706 – Alto da XV

CEP: 80040-000 Curitiba – Paraná – Brasil

Tel. (55) 41 2632257 Fax: (55) 41 2626699

e-mail: [diclervb@terra.com.br](mailto:diclervb@terra.com.br)

*Declaration of interests*

The authors declare that there is not any commercial or financial interest entailed to publication. This work belongs to academic interest and is entailed to Master's Dissertation developed at Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Básica, and there are no interest conflicts among authors.

## Abstract

The aim of this study was the investigation of the adherence capacity of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* separately and associated. It was performed "in vitro" adherence assay in the dental surface whose analysis was done through Scanning Electron Microscopy (SEM). For this adherence assay, systems with human teeth in Gibbons and Nygaard medium were used, added to the *C. albicans* and *S. mutans* inoculums separately and associated, incubated during 21 days. The isolated ones were obtained from salivary samples from children coinfecting and reference lineages ATCC of the two microorganisms. The analysis by SEM showed smaller adherence of *C. albicans* than *S. mutans* in the dental surface when inoculated separately. When associated, *C. albicans* presented increased adherence. The *S. mutans* adherence, when associated to *C. albicans*, also was favored, showing increased colonization. A second experiment was developed to confirm this adherence quantitatively, using acrylic samples as "in vitro" adherence system and the isolated with contrasting behaviors of the first assay as inoculums. The results confirmed that when *C. albicans* and *S. mutans* were associated, there was improved adherence from both, however *S. mutans* demonstrated to be the most benefited in this association. The results obtained by the two "in vitro" adherence assays allow to suggest that in despite the oral microbial interactions are much more complex, the presence of the two microorganisms associated can privilege the adherence from both, and the consequent increased colonization of *S. mutans* could be considered another important factor to the risk of caries.

## Introduction

The oral microbiota plays an important role in the oral health and oral diseases development deriving from the alteration of this ecosystem. It contributes for the development of the immune system, allowing the balanced colonization of a variety of microorganisms, and it can constitute a reservoir of microorganisms potentially invasives to the tissues of the host.

The complexity of this ecosystem depends on the age of the host, ability and immunologic potential, the appearance of new niches, dietary changes, oral hygiene, antimicrobial agents and exposure to the fluoride [Marcotte and Lavoie, 1998]. All of these associates factors will be able to interfere in the colonization mechanisms, adherence and coaggregation microbial [Marcotte and Lavoie, 1998; Kolenbrander, 2000].

One of the oral diseases that reflects failure in the balance of this microbiota is the caries that in its progression draw on the tissues destruction mineralized of the teeth. The disease is considered infectious, transmissible and multifactorial, being the main etiologic agent the bacteria *Streptococcus mutans*, capable to adhere on dental surfaces and initiate the formation of the cariogenic dental plaque, and its metabolic system generates a acidogenic niche, extrapolating the salivate tampon capacity, unchaining progressive alterations in the mineral layer of the dental surface [ Kreulen et al., 1997; Grönroos, 2000].

In patients with caries high activity, the *S. mutans* concentration in the saliva is frequently elevated and varies from host for host. Several factors related to oral ecology are attributed to the conditions that favor the *S. mutans* establishment and multiplication in the oral

environment. The genetic characteristics of the host associated to oral microbiota are the most important [Carlsson et al.,1985].

According to the literature [Sen et al., 1997.; Arendorf and Walker, 1980; Samaranayake and MacFarlane, 1980], *Candida albicans* has been isolated in the dental plaque, however its paper in coaggregation to *S. mutans* during the mechanisms of microbial adherence on the dental surface is still a reason for investigation. The presence of *C. albicans* in established carious lesions has been demonstrated, besides invasion capacity of the tissues and of artificial materials in the oral cavity, such as the acrylic used in many types of prosthesis [ Nikawa et al.,2003; Akdeniz et al., 2002; Sen et al., 1997, Cannon et al., 1995; Marcotte and Lavoie, 1998; Minagi et al., 1985].

The interrelation hypothesis of *S. mutans* and *C. albicans*, is based on their virulence mechanisms and biochemical characteristics, associated to both endogenous and exogenous factors that propitiate the host an oral environment that favors the performance of the two microorganisms [ Akdeniz et al., 2002; Moalic et al., 2001].

Many studies “in vitro”[ Sen et al., 1997; Nikawa et al.,2003; Nikawa et al. 1998] have suggested that *C. albicans* is a plaque colonizer organism. However, a few investigations have concentrated on the study of microorganisms succession adhering as primary or secondary colonizers [Radford et al., 1999].

Inside this context, the analysis of the “in vitro”adherence behavior of the *S. mutans* and *C. albicans* will be able to be useful for bringing subsidies to assist in the understanding of the behavior of these two microorganisms in the oral cavity. This way, it was proposed an adherence “in vitro” rehearsal using human teeth as adherence surface, and as inoculums *S. mutans* and *C. albicans*, obtained through children' s

coinfecting saliva samples and reference lineages of the two microorganisms with purpose of investigating the behavior adherence of *S. mutans* in the dental plaque “in vitro” in the presence of *C. albicans*.

## Materials and methods

This research was approved by the Ethics Committee in Research and all the involved patients in this study, with written approval in term of consent.

### Yeast and bacteria strains

For the adherence tests isolated of *S. mutans* and *C. albicans* were used, obtained from children's saliva samples coinfecting assisted at Clínica de Odontopediatria –Departamento de Estomatologia - Setor de Ciências da Saúde and lineages ATCC of *C. albicans* 10231 and of *S. mutans* 25175.

### *Isolation and Identification of Microorganisms*

The salivary samples were diluted, inoculated in Sabouraud Dextrose Agar medium, and incubated at 30<sup>o</sup> C for 48 hours to 7 days for isolation of *C. albicans*. For *S. mutans* isolation the salivary samples were submitted to decimal dilutions and cultured in Mitis Salivarius Agar (Difco), added bacitracin (30µg/ml) and potassium telurite (0,001%), and the plates were incubated in a microaerobic atmosphere, into Gaspack's jars at 37<sup>o</sup> C for 48 hours.

For the identification of *S. mutans*, presumptive colonies were subcultured and submitted by scheme biochemistry [Koneman et al., 1997; Petti and Hausen, 2000]. For *C.*



*albicans* identification, presumptive colonies were submitted to germ tube test and subsequent mechanized identification by Vitek system (Identification Card, bioMérieux ).

### *Adherence "In Vitro" Assay With Human Teeth*

#### *Prepare of Inoculum*

For each inoculum different isolated were used the obtained from children coinfectad, which were cultivated at 37°C for 18h, and standardized in the concentration of  $2,1 \times 10^9$  cells/ml, based on MacFarland scale and spectrophotometric. The inoculums were performed using *S. mutans* (M), *C. albicans* (C) and *S. mutans* +*C. albicans* (M+C).

#### *Adherence System Confection*

Twenty-one human premolar teeth extracted by orthodontical reasons, donated by the patient through donation term, were used in this study. The teeth were stored in physiologic solution with weekly changes until their prepare. These teeth were prepared with mechanical cleaning using pumice and water, perforated with the use of a spherical dentistry drill (Sorensen n<sup>0</sup>2). Through this orifice a dental floss was passed to assist in the manipulation of the teeth. The prepared teeth were submitted to sterilization with pressure of 1 atm, 121°C for 20 min.

Each tooth was introduced into a tube with 9 ml of medium culture liquidate Gibbons & Nygaard [Gibbons and Nygaard, 1968], and added 1 ml of each inoculum in each tube: *S. mutans*, *C. albicans* and both associates. The systems were incubated at 37°C for 21 days with change of the medium culture every 48 hours, with confirmation of the purity of the cultivation for coloration of Gram and optic microscopy.

#### *Scanning Electron Microscopy*

To visualize the yeast cells and streptococci, the teeth were fixed in Karnovick's Solution, washed in 0,05M sodium cacodylate buffer (pH 7,4) three times. After the fixation and washes, they were cutted with diamond disks and dehydrated through graded series of acetone 30%-50%-90%-100% (2X), and sputter-coated with gold.

#### *Adherence "in vitro" Assay for Quantitative Analysis*

##### *Prepare of Inoculum*

The inoculums were constituted of *S.mutans* (M), *C. albicans* (C) and *C. albicans* + *S. mutans* (C + M ), respectively, cultivated at 37°C for 18 hours and standardized in the concentration of  $6 \times 10^8$  cells/ml, based on the MacFarland scale and spectrophotometric.

##### *Adherence System Confection*

Pieces of acrylic of 0,5cm X 2,5cm previously sterilized were used and introduced into "ependorfs" containing 0,9ml of culture medium liquidate Gibbons & Nygaard, added of the 0,1ml of inoculums (*S.mutans*; *C.albicans* or *S.mutans* + *C.albicans*). The cultivation was done at 37°C for different periods of incubation (2, 12, 24, 48 e 72 hours). It was done two repetitions for each period.

##### *Adherence Estimative*

After incubation the adherence systems were washed three times with PBS, to remove unbound cells, and inside each ependorf it was added 1ml of Phosphate Buffered Saline (PBS) and 2 glass pearls, shaking them in the magnetic agitator for 30 seconds for liberation of the adhered cells on the piece of acrylic, forming a suspension. For each

suspension different dilutions with PBS was prepared, according to growth periods ( $10^{-1}$  for 2 hours,  $10^{-2}$  for 12 and 24 hours and  $10^{-3}$  for 48 and 72 hours), and 0,1ml of each dilution was inoculated in Gibbons & Nigaard Agar. The plates were incubated at 37°C for 48 hours and the growth was evaluated based on CFU/cm<sup>2</sup>.

#### *Statistical analysis of Quantitative Assay*

The average values of adherence were evaluated by the ANOVA variance analysis, following the entirely casual delineation, with two repetitions and factorial distribution of the treatments *S.mutans* (M) ; *C.albicans* (C ) e *S.mutans* + *C.albicans* (C+M) and times of cultivation (2, 12, 24, 48 and 72 hours), considering a confidence interval of 95% ( $p > 0,05$ ). The multiple comparisons were prosecuted through the orthogonal contrasts of the test F according to [Hinkelmann and Kempthorne ,1994].

## **Results**

The analysis of teeth by SEM revealed that the group of teeth that had been incubated with *S. mutans* and *C. albicans* associated (C+M), presented uniform and dense biofilm adherence in the whole analyzed dental surface, cells of *C. albicans* with blastosporos morphology and pseudohyphae, and presence of amorphous substance binding the cells of both microorganisms. It was noticed that cells of *S. mutans* covered the surface of the cells of the yeast (Figure 1 A and B).

When *S. mutans* was cultivated alone, it was observed the adherence on the dental surface forming a thick and compact biofilm, with cells rightly grouped (Figure 1 C), while as for the yeast *C. albicans* cultivated separately, it was possible to observe cells adhered

to the dental surface, with predominance of filamentous morphology, showing several budding (Figure 1 D).

The results obtained by the quantitative analysis of the adherence test in acrylic model are showed in the Table 1, and they represent the adherence values in CFU/cm<sup>2</sup> to the groups *S. mutans*, *C. albicans* and both associated.

In the isolated cultivation, a considerable variation in the adherence values was observed for the period of 48 hours, showing that in this case, the adherence of associated microorganisms was higher than separately (Table 1). According to the accomplished statistical analysis, it was observed that the adherence of *S. mutans* cultured in the presence of *C. albicans*, when compared to the *S. mutans* alone, was significant ( $p=0,0279$ ), within the confidence limit of 95% ( $p=0,005$ ), in the period of 48 hours of cultivation. Regarding other periods, observed values were not statistically significant (Table 2).

In the period of 72 hours also occurred deviations, however smaller than the observed ones in 48 hours. In this period, *C. albicans* when cultivated alone showed different behavior from the other groups, it continued increasing its adherence in 72 hours, however, such relation was not statistically significant (Table 2).

## **Discussion**

The SEM images, referring adherence of *S. mutans* and *C. albicans*, associated, showed an increase of the adherence in every analyzed dental surface, forming a net, constituted by the cells of the two microorganisms and an amorphous substance (Figure 1 A and B). The intensity of the colonization by *S. mutans* was very evident when cultivated

in the presence of *C. albicans* indicating that the *S. mutans* seemed to have been the most favored in this association where the cells increase of the yeast can have generated an increase in the support of adherence.

The quantitative analysis of the tests of adherence “in vitro”, it confirms the results obtained by SEM, demonstrating that the association favored the adherence of the two microorganisms, being *S. mutans* the most benefited mainly in the period of 48 hours of cultivation, according to statistical analysis (Table 2).

Regarding *C. albicans* cells during association, it was observed the predominance of unicellular morphology, with blastosporos formation which could be explained by the presence of *S. mutans* and its metabolic products, which ones to exercise a facilitative function in coaggregation of both microorganisms, promoting an increase of the growth of the blastosporos, difficulting the expression of the filamentous forms, although germ tubes were observed (Figure 1 A and B).

Moreover, it can suggest that the absence of competition favored the filaments production and probably the tissue invasion of the yeast when cultivated separately.

According to Soll [2002], *C. albicans* has the capability of reversibility, differentiating between a round budding growth form and a hyphal growth form. Both of these forms are associated to commensalism and disease, although it is generally believed that the budding form is predominant in commensalism.

Nikawa et al. [2001] analyzing the coadherence of *C. albicans* with oral bacteria also found predominant presence of blastosporos of *C. albicans* during coadhesion with *S. mutans* in medium supplemented with sucrose. The authors considered in clinical terms, the networks of intergeneric coaggregations are considered to play an important role in the ecology of oral biofilms.

Due to the colonization factors and virulence of *C. albicans*, its presence in microbiotas with caries activity is completely justifiable, for being a microorganism dentinophilic, aciduric, and with high adherence affinity [Sen et al., 1997], however the etiology of the caries is attributed to *S. mutans*. *C. albicans* has efficient mechanisms of adherence, its colonization in the oral cavity can represent a factor in furtherance potential to the interaction with *S. mutans*, and some works have walked in this direction [Moalic et al., 2001; Akdeniz et al., 2002; Nikawa et al., 2003].

Many studies about interaction between *C. albicans* and *S. mutans*, use analysis “*in vitro*”, however such experiments are frequently accomplished with reference lineages, or still in some of them, they are used isolated of *S. mutans* and *C. albicans* from hosts, however, of different individuals, as in [ Branting, et al., 1989 ; Nikawa et al., 1998; Nikawa et al., 2001; Nikawa et al., 2003], could not always reflect the real interaction in the oral cavity. This way, the use of isolates deriving from coinfection, used in this work, provide a starting point for wide discussion.

The association of the two microorganisms can be understood as a cooperation relation, as they were both favored, and the amorphous substance seemed to have facilitated the coaggregation. This fact also can explain the formation of aggregates in the medium of the culture, during the cultivation of the teeth, observed when microorganisms were cultivated together. Branting et al. [1989] studying the adherence behavior of *C. albicans* associated to *S. mutans* in acrylic surfaces, suggested that the presence of insoluble glucans produced by *S. mutans* increased the adhesion capacity of the yeast during the associated cultivation. Nikawa et al. [2001], also observed by SEM the

presence of coaggregates composed by bacteria cells covering again the surface of the cells of the yeast, although they did not use any support material for adherence.

Studies “*in vitro*” can help in the understanding of these associations, however the dynamics of this mechanism in the oral environment, added to other microorganisms of microbiota, immunologic mechanisms of the host and, especially diet and oral hygiene can regulate these mechanisms [Kolenbrander, 2000].

According to the obtained results, there are evidences that *C. albicans* can increase the adherence of *S. mutans* in biofilm performing a facilitative function of colonization and adherence to the *S. mutans*, which implies that is an important related factor to increase of the risk of caries, fact already suggested by Moalic et al. [2001].

### **Acknowledgements**

The authors thank the Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná; Centro de Microscopia Eletrônica NAP/MEPA-ESALQ-Universidade de São Paulo and the Prof. Dr. Osmir José Lavoranti, who executed the statistical analysis of this work.

### **References**

- Akdeniz B G, Koparal E, Sen B H, Ates M, Denizci, A A : Prevalence of *Candida albicans* in oral cavities and root canals of children. Journal of Dentistry for Children 2002; 69 (3): 289-292,
- Arendorf, T M, Walker D M : The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. Arch Oral Biol 1980;.25: 1-10.

- Branting C, Sund M-L, Linder LE: The influence of *Streptococcus mutans* on adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces *in vitro*. Arch Oral Biol 1989; 34:347-353.
- Cannon R D, Holmes A R, Mason A B, Monk B C: Oral Candida: clearance, colonization or Candidiasis. J Dent Res 1995; 74:1152-1161.
- Carlsson P, Olsson B, Bratthall D: The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique. Arch Oral Biol 1985; 30: 265-268.
- Gibbons RJ, Nygaard M: Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque forming streptococci. Arch Oral Biol 1968; 13:1249-1262.
- Grönroos L: Quantitative and Qualitative Characterization of Mutans Streptococci in Saliva and in the Dentition. Helsinki, 2000. 80 f. Academic Dissertation. Department of Pedodontics and Orthodontics, Institute of Dentistry, University of Helsinki and Department of Oral and Maxillofacial Diseases, Helsinki University Central Hospital.
- Hinkelmann, K.; Kempthorne, O: Design and analysis of experiments. vol.1: Introduction to Experimental Design. John Wiley & Sons, 1994.
- Kolenbrander PE: Oral microbial communities: biofilms, interactions and genetic systems. Annu. Rev. Microbiol. 2000; 54: 413-437.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr. WC: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology – 5<sup>th</sup> edition. Lippincott-Raven Publishers.1997.
- Kreulen C M, De Soet H J, Hogeveen R, Weerkamp J S: *Streptococcus mutans* in children using nursing bottles. ASDC Journal of Dentistry for Children 1997; 64:107-111.



- Marcotte H, Lavoie MC: Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998; 62: 71-109.
- Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Sugiyama H: Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immun* 1985; 47:11-14.
- Moalic E, Gestalin A, Quinio D, Gest PE, Zerili A, Le Flohic AM: The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. *Caries Res* 2001;35: 149-155.
- Nikawa H, Egusa H, Makihira S, Yamashiro H, Fukushima H, Jin C, Nishimura M, Pudji RR, Hamada T: Alteration of the coadherence of *Candida albicans* with oral bacteria by dietary sugar. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16:279-283.
- Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Murata H, Subiwahjudi A: The effect of saliva or serum on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* colonization of hydroxyapatite beads. *Journal of Dentistry* 1998; 26:31-37.
- Nikawa H, Yamashiro H, Makihira S, Nishimura M, Egusa H, Furukawa M, Setijanto D: *In vitro* cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses* 2003; 46: 471-478.
- Petti S, Hausen H W : 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: 380-387.
- Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD: Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10:99-116.

Samaranayake LP, MacFarlane TW: An *in-vitro* study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. Arch Oral Biol 1980; 25:603-606.

Sen BH, Kamran ES, Larz SW: Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology 1997; 84:68-73.

Soll DR: *Candida* commensalisms and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. Acta Tropica 2002; 81: 101-110.

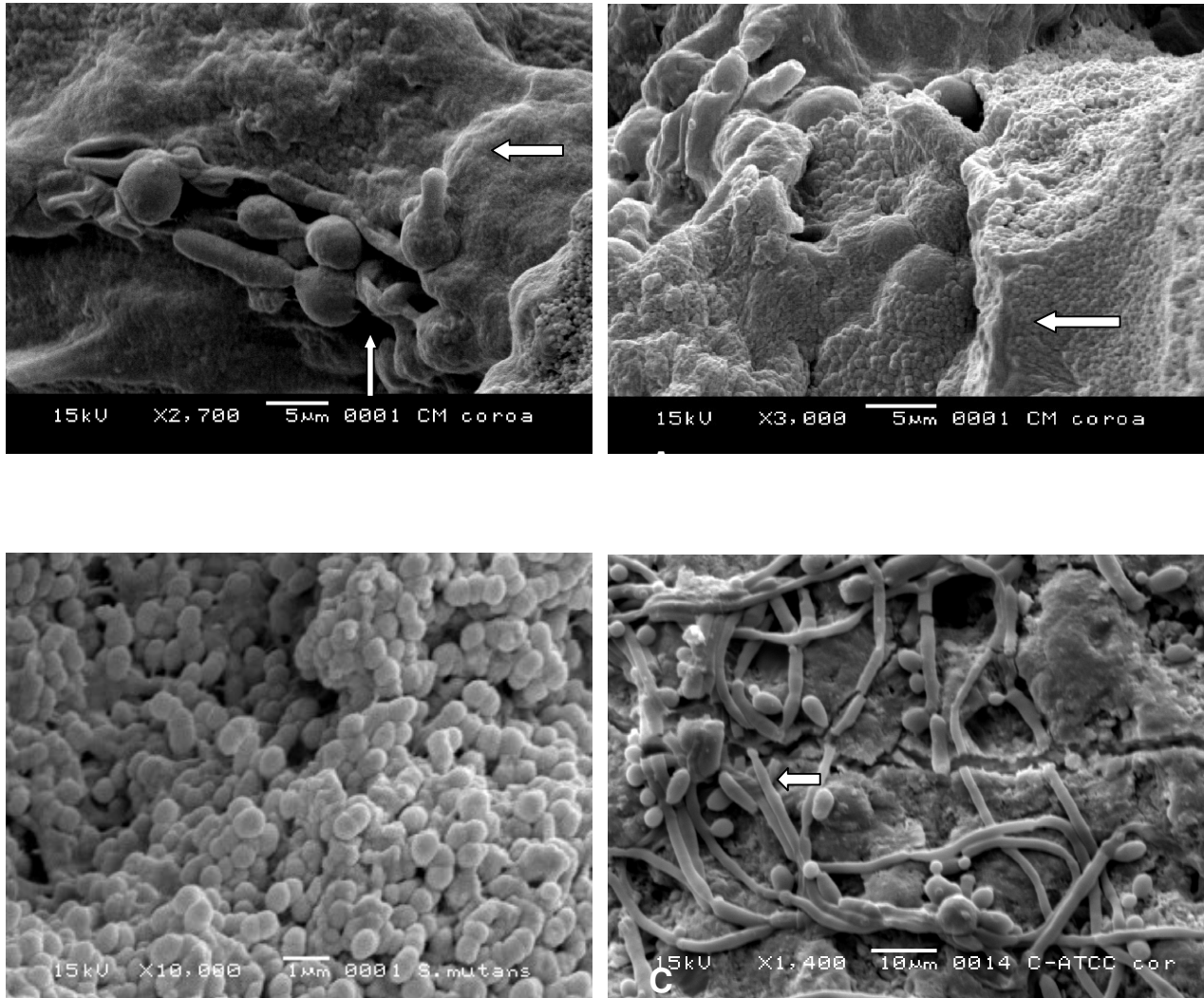
**Table 1** – Adherence median values and standard deviation in CFU/cm<sup>2</sup>.

Microorganism	Incubation time (hours)				
	2	12	24	48	72
<i>S. mutans</i>	3.2674x10 <sup>4</sup>	5.5525x10 <sup>5</sup>	1.4790x10 <sup>6</sup>	7.3440 x10 <sup>6</sup>	2.2190 x10 <sup>6</sup>
	±5.2813x10 <sup>4</sup>	±1.6016x10 <sup>5</sup>	±5.9080x10 <sup>5</sup>	±7.0312 x10 <sup>6</sup>	±1.9442x10 <sup>6</sup>
<i>C. albicans</i>	3.4404 x10 <sup>4</sup>	3.9850 x10 <sup>5</sup>	1.3309 x10 <sup>6</sup>	3.5269 x10 <sup>6</sup>	4.4125 x10 <sup>6</sup>
	±2.7157x10 <sup>4</sup>	±1.9314x10 <sup>5</sup>	±3.2013 x10 <sup>5</sup>	±3.1129 x10 <sup>6</sup>	±2.7958 x10 <sup>6</sup>
<i>S. mutans</i> associated	2.6872 x10 <sup>4</sup>	5.5220 x10 <sup>5</sup>	1.2963 x10 <sup>6</sup>	1.2952 x10 <sup>7</sup>	5.2930 x10 <sup>5</sup>
	±4.4348x10 <sup>4</sup>	±3.4659x10 <sup>5</sup>	±6.3065 x10 <sup>5</sup>	±5.7292 x10 <sup>6</sup>	±6.7952 x10 <sup>5</sup>
<i>C. albicans</i> associated	3.4659 x10 <sup>4</sup>	2.9060 x10 <sup>5</sup>	1.3472 x10 <sup>6</sup>	7.7104 x10 <sup>6</sup>	4.8654 x10 <sup>6</sup>
	±1.0943x10 <sup>4</sup>	±6.8511x10 <sup>4</sup>	±4.3890 x10 <sup>5</sup>	±5.3107x10 <sup>6</sup>	±2.3931 x10 <sup>6</sup>

**Table 2** – Orthogonal contrasts of the test F (confidence range of 95 %)

Time (hours)	Contrast	DF	Mean Square	F value	Pr > F	Significant
2	C vs C+M	1	345845.0	0.00	0.9876	no
	M vs M+C	1	167157620.0	0.12	0.7320	no
12	C vs C+M	1	58104200000	1.23	0.2738	no
	M vs M+C	1	38920500	0.00	0.9772	no
24	C vs C+M	1	1022450000	0.00	0.9504	no
	M vs M+C	1	160742450000	0.62	0.4371	no
48	C vs C+M	1	8.737036E13	2.91	0.0965	no
	M vs M+C	1	1.5752885E14	5.25	0.0279	yes
72	C vs C+M	1	1.0296722E12	0.23	0.6333	no
	M vs M+C	1	1.4251784E13	3.20	0.0818	no

C = *C. albicans*; M = *S. mutans*; C+M = *C. albicans* associated to *S. mutans*; M+C = *S. mutans* associated to *C. albicans*



**FIGURE 1 - SEM micrographs:** **A** – Magnification of 2700x of *C. albicans* associated to *S. mutans* on dental surface. Arrow = Abundant amorphous extracellular structures are seen between cocci and yeast cells. Arrow = *Candida* cells exhibiting germ tubes. **B** – Magnification of 3000x. *C. albicans* associated to *S. mutans* on dental surface. Arrow = Abundant amorphous extracellular structures are seen covering the cells yeast surface and offering support of adherence. **C** – Magnification of 10000x of adherence pattern of *S. mutans* cells on dental surface showing closely grouped cells. **D** - Magnification of 1400x. Adherence pattern of *C. albicans* cultured alone, on the dental surface. Arrow = Filamentous morphology of cells with budding.