

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO BIOFILME SOBRE A SUPERFÍCIE CARIADA EM PRÉ-ESCOLARES DE 36 A 60 MESES COM CÁRIE PRECOCE DA INFÂNCIA

Gabriela S. Correa^{1*}, Lívia P. Rodrigues², Marinês N. S. Uchôa³

1. Estudante de IC da Fac.de Odontologia de Piracicaba da Unicamp (FOP)

2. Doutoranda da FOP.

3. Professora livre docente na área de Odontopediatria da FOP.

Resumo:

A cárie precoce da infância é definida como a presença de uma ou mais superfícies dentais cariadas (cavitadas ou não), perdidas ou obturadas (ceo-s) em pré-escolares com idade inferior a seis anos. O presente estudo avali a prevalência da cárie precoce da infância em pré-escolares de 36 a 60 meses, com o objetivo de diferenciar a composição microbiológica do biofilme sobre a superfície dentária nos diferentes estágios da doença (lesão de mancha branca ativa e lesão cavitada). No biofilme dental foram determinadas as porcentagens de *Actinomyces naeslundii*, *Bifidobacterium spp*, *Streptococcus mutans*, *Veillonella dispar* e Grupo dos comensais (pela dosagem de *Streptococcus mitis* e *Streptococcus gordonis*). Os resultados deste estudo evidenciaram que crianças com lesão de cárie cavitada apresentaram as maiores quantidades de *Streptococcus mutans* e *Bifidobacterium spp* em relação a crianças livre de cáries ou com lesão de mancha branca ativa.

Palavras-chave:

cárie precoce na infância; placa dentária; microbiologia

Apoio financeiro:

CNPq

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:

FOP-UNICAMP

Autorização legal:

O estudo somente foi conduzido após aprovação pelo comitê de ética e pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, tendo sido aprovado sob número de protocolo 30686114. Todos os responsáveis pelos voluntários assinaram um “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, explicando a realização do estudo, objetivos, riscos e benefícios aos quais estariam expostos, de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº196/96).

Introdução:

A cárie precoce na infância é uma doença multifatorial que clinicamente apresenta lesões iniciais de manchas brancas opacas no terço cervical da superfície vestibular e lingual dos incisivos decíduos superiores, e se não for diagnosticada e controlada em uma fase precoce, essas lesões progridem, tornando-se cavitadas.

A progressão da doença pode causar consequências graves como dor, infecção, dificuldade na mastigação, desnutrição e distúrbios gastrointestinais, além de gerar danos ao desenvolvimento do sistema estomatognático da criança, o que pode contribuir para a instalação de hábitos parafuncionais, além da perda do guia de erupção dos dentes permanentes. Ainda, estudos mostram que essas crianças apresentam piores condições na qualidade de vida, considerando-se os aspectos psicossociais.

A cárie apresenta três fatores primários, sendo eles, a presença de bactérias cariogênicas, carboidratos fermentáveis e hospedeiros ou superfície dentária susceptível, os quais interagem em determinado período de tempo. Entre esses fatores, a frequência de exposição à sacarose tem sido destacada como responsável pelas alterações orgânicas inorgânicas e microbiológicas no biofilme dentário. Em crianças jovens, um elevado número de bactérias cariogênicas como *Streptococcus mutans* (SM) e *Lactobacillus*, a presença de biofilme dental visível na região anterossuperior dos dentes decíduos, práticas inadequadas de alimentação, nível socioeconômico e escolaridade materna têm sido identificadas como fatores importantes na predição do desenvolvimento de cárie.

Em relação à microbiota, existe uma mudança na composição do microbioma entre a condição de saúde e a doença, mas que nem sempre pode ser claramente diferenciada, uma vez que a doença não é uma questão de ausência ou presença de agentes patógenos, mas sim uma consequência da alteração na proporção dos mesmos. Vários estudos avaliaram a etiologia da CPI e mostraram que o *S. mutans* está particularmente relacionado com o desenvolvimento da doença.

O objetivo deste estudo foi identificar e quantificar a microbiota sobre a superfície cariada nos diferentes estágios da doença (lesão de mancha branca ativa e lesão de cárie cavitada) em crianças com idade de 36 a 60 meses. Este trabalho buscou aprofundar o conhecimento dos possíveis fatores de risco

relacionados ao processo de início e instalação da CPI, assim como auxiliar na implementação de estratégias que visem à prevenção e o controle dessa doença.

Metodologia:

Para a seleção das creches municipais, foi realizado um sorteio, utilizando-se o programa estatístico Bioestat 5.0, de modo a permitir que todas as creches de diferentes áreas da cidade, periféricas ou centrais, tivessem a mesma chance de serem escolhidas. As oitenta creches da cidade de Piracicaba-SP foram numeradas de 1 a 80 e cinco delas foram escolhidas por sorteio.

Os pesquisadores deste estudo realizaram a entrega dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Todos os procedimentos e exames a serem executados foram explicados e os TCLEs foram entregues aos responsáveis para que os mesmos manifestassem a anuência ou desacordo em relação à participação das crianças na pesquisa.

As crianças cujos responsáveis autorizaram a participação na pesquisa foram avaliadas e o biofilme dental foi coletado em um único momento. Para a coleta, foram utilizadas sondas de pontas rombas e o biofilme coletado foi armazenado em microtubos contendo 220 µL de solução Tris-EDTA (TE), devidamente identificados com o número da criança e com a designação do tipo de superfície da qual o biofilme foi coletado (superfície hígida, lesão de mancha branca – LMB ou lesão cavitada por cárie – LCC). Após a coleta, o biofilme foi armazenado em isopor com gelo e transportado até a Faculdade de Odontologia de Piracicaba, onde foi armazenado em freezer a -80°C.

As amostras de biofilme foram descongeladas em temperatura ambiente e submetidas aos processos de estabilização e purificação dos ácidos nucleicos usando o protocolo fenol clorofórmio.

A leitura para a determinação da concentração e pureza das amostras foi feita em espectrofotômetro (Nanodrop 2000 – ThermoScientific, EUA). O DNA purificado foi diluído em tampão Tris-HCl 0,01M para 10 ng/µL e armazenado a -20°C.

As amostras foram analisadas por qPCR (reação em cadeia de polimerase - quantitativo) para a detecção e quantificação de *Actinomyces naeslundii*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus mutans*, *Veillonella spp* e Grupo dos comensais (pela dosagem de *Streptococcus mitis* e

Streptococcus gordonii), a partir do DNA purificado obtido da coleta das amostras. Para isto, pares de *primers* específicos para cada gene foram selecionados a partir de trabalhos da literatura. Cada par de *primer* amplificou sequências entre 100 e 200 pb. Foi utilizado o gene 16S, como gene universal para avaliação da qualidade das amostras.

Os ensaios de qPCR foram realizados em duplicata, a partir de amostras DNA. Como um dos controles negativos da reação, misturas sem DNA foram incluídas para assegurar a ausência de DNA contaminante. Para cada corrida, curvas de amplificação de DNA extraído da cepa padrão em quantidades crescentes (0,03; 0,3; 3; 30 e 300 ng/poço) foram realizadas. Os valores de expressão de cada gene teste foram normalizados pelo gene 16S, os quais foram considerados como 100% do DNA bacteriano e calculou-se a porcentagem de cada bactéria testada em relação ao total.

Resultados e Discussão:

Os resultados deste estudo mostraram que há uma maior proporção de *S. mutans* no biofilme sobre as superfícies com cárie no estágio inicial da doença e na lesão já cavitada, em relação ao biofilme presente na superfície hígida. O grupo *Bifidobacterium spp* teve a menor porcentagem relativa no biofilme sobre a lesão de mancha branca e sobre a superfície hígida, quando comparado ao biofilme sobre as lesões de cárie com cavitação. Além disso, *Actinomyces spp*, *Veillonella spp*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus gordonii* mostraram valores semelhantes para os diferentes grupos.

O *S. mutans* esteve presente em maiores quantidades no biofilme de crianças com lesões de mancha branca e lesões de cárie já cavitadas, estando de acordo com vários estudos clínicos que mostraram o papel do *Streptococcus mutans* no desenvolvimento e progressão da cárie.

Alguns estudos avaliaram os mecanismos de desenvolvimento da cárie e mostraram que a desmineralização no esmalte é induzida pelo aumento da acidez do microambiente ao redor dos dentes, e tal acidez deu-se principalmente por um grupo específico de bactérias, como *Lactobacillus acidophilus*, entretanto, como uma das limitações deste estudo, não foi possível ser realizada a dosagem dos *Lactobacillus acidophilus*. Já *Bifidobacterium spp* tiveram quantidades significativamente superiores no grupo de crianças com a lesão já cavitada.

Actinomyces spp e *Veillonella spp* apresentaram resultados similares em relação aos diferentes grupos.

Os resultados não foram capazes de evidenciar diferença significativa na quantidade de *Streptococcus mitis* e os *Streptococcus gordonii*, embora alguns estudos mostrem que estas espécies não atuam negativamente na doença cárie.

Conclusões:

O presente estudo mostrou que as porcentagens de *Streptococcus mutans*, e *Bifidobacterium spp* no biofilme dental foram significativamente maiores no biofilme de crianças com lesão de cárie cavitada, quando comparadas a aquelas presentes no biofilme de crianças livres de cárie ou com o estágio inicial da doença.

Referências bibliográficas

Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, Leys EJ, Paster BJ. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. J Clin Microbiol. 2008 Apr;46(4):1407-17.

Babaahmady KG, Challacombe SJ, Marsh PD, Newman HN. Ecological study of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus spp*. at sub-sites from approximal dental plaque from children. Caries Res 1998;32:51-8.

Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, Boches SK, Dewhirst FE, Griffen AL. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. J Clin Microbiol. 2002;40:1001-9.

Drury TF, Horowitz AM, Ismail AI, Maertens MP, Rozier RG, Selwitz RH. Diagnosing and reporting early childhood caries for research purposes. A report of a workshop sponsored by the National Institute of Dental and Craniofacial Research, the Health Resources and Services Administration, and the Health Care Financing Administration. J Public Health Dent. 1999;59(3):192-7.

Feitosa S, Colares V, Pinkham J. The psychosocial effects of severe caries in 4-year-old children in Recife, Pernambuco, Brazil. Cad Saude Publica. 2005; 21(5):1550-6.

Filstrup SL, Briskie D, da Fonseca M,

Lawrence L, Wandera A, Inglehart MR. Earlychildhood caries and quality of life: child and parent perspectives. *Pediatr Dent*.2003 Sep-Oct;25(5):431-40.

Isaksson H, Alm A, Koch G, Birkhed D, Wendt LK. Caries prevalence in Swedish 20 - year-olds in relation to their previous caries experience. *Caries Res*. 2013 ;47(3):234-42.

Jiang W, Zhang J, Chen H. Pyrosequencing analysis of oral microbiota in children with severe early childhood dental caries. *Curr Microbiol*. 2013 Nov;67(5):537 -42

Mattos-Graner RO, Corrêa MS, Latorre MR, Peres RC, Mayer MP. Mutans streptococci oral colonization in 12-30-month-old Brazilian children over a one-year follow-up period. *J Public Health Dent*. 2001 Summer;61(3):161-7.

Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. 2002 Jan;148(Pt 1):257-66.

Nobre dos Santos M, Melo dos Santos L, Francisco SB, Cury JA. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. *Caries Res*. 2002;36(5):347-52.

Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Duque C, Peres RC, Rodrigues LK, Nobre-dos- Santos M. Relationship among microbiological composition and presence of dental plaque, sugar exposure, social factors and different stages of early childhood caries. *Arch Oral Biol*.2010;55(5):365-73.

Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res* 2008;42:409–18.

Paula JS, Lisboa CM, Meneghim MC, Pereira AC, Brovi Ambrosano, Glauca Maria, Mialhe FI. School performance and oral health conditions: analysis of the impact mediated by socio-economic factors. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2016 Jan, 26(1):52-9.

Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol*. 2004;97(6):1166-77.

Seow WK. Biological mechanisms of early childhood caries. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1998;26(1):8-27.

Wolff D, Frese C, Maier-Kraus T, Krueger T, Wolff B. Bacterial biofilm composition in caries and caries-free subjects. *Caries Res*. 2013;47(1):69-77.

Yano A, Kaneko N, Ida H, Yamaguchi T, Hanada N. Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002 Nov 19;217(1):23-30.