CDU 611.314.5/.6-008.87

ANÁLISE DA MICROBIOTA DE FISSURAS DE DENTES MOLARES E PRÉMOLARES HÍGIDOS DE HUMANOS (Estudo quantitativo)

Lucia Knewitz Boschetti *
Luiz Carlos Tovo **
José Oscar Schneider Santos **
Rui Vicente Oppermann *

S I N O P S E

De 5 pacientes portadores de dentes pré-molares e molares hígidos, após 24 horas sem higiene oral, foi recolhido material depositado sobre suas fissuras após revelado com vermelho de eritrosina 0,25%, para análise dos grupos de microrganismos presentes. O material foi cultivado em agar sangue, para a análise dos viáveis, e em agar Veillonella, agar SL, TSA e meio de McCarthy para o estudo de Veillonella, Lactobacillus, germes sintetizadores de amilopectina e Fusobacterium, respectivamente.

Os resultados mostraram os cocos Gram-positivos perfazendo 58%, os cocos Gram-negativos 32% e os bacilos Gram-positivos 10% dos microorganismos viáveis. Bacilos Gram-negativos, não foram encontrados.

INTRODUÇÃO

A cavidade oral alberga uma microflora variada e extremamente numerosa. Análises quantitativas de material colhido de diferentes nichos têm permitido definir a composição da microbiota da placa dental de superfícies lisas (Gibbons et alii,[8] 1964; Schneider Santos et alii,[17] 1969), do sulco gengival em condições normais (Gibbons et alii,[7] 1963; Araújo e Mac Donald,[1] 1964) e com doença periodontal (Gibbons et alii, [7] 1963) e do dorso da língua (Krasse,[11] 1954; Gordon e Gibbons,[9] 1966).

As pesquisas têm sido realizadas visando: 1º determinar as microbiotas próprias de cada nicho; 2º possíveis alterações quantitativas em diferentes condições experimentais; 3º qual a participação dos diversos tipos bacterianos na etiologia da cárie dental e da doença periodontal.

Sobre o dente, as bactérias colonizam nas superfícies lisas, pela deposição de um polissacarídeo com propriedade de adesão — o dextrano — produzido, principalmente, por um grupo de estreptococos.

* Bolsistas de Iniciação à Pesquisa da U.F.R.G.S.
** Professores Adjuntos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Biociências da U.F.R.G.S.

A formação desta placa dental é o passo inicial para a ocorrência de cáries de superfícies lisas e da doença periodontal de natureza inflamatória.

A microbiota das fissuras das faces oclusais de molares e pré-molares ainda não foi analisada quanto à sua composição. Em animais foi sugerido (Larson et alii, [12, 13, 14] 1965, 1967) que as bactérias associadas à cárie de fissuras são componentes normais da microbiota destes animais.

Keyes,[10] (1968), em uma revisão sobre cárie dental, enumera uma série de perguntas a serem respondidas para a consecução de melhores programas de prevenção de cárie e, a primeira questão que formula é: «Quais os tipos de microrganismos que se acumulam nas fissuras oclusais?»

No presente trabalho, foi feita uma análise quantitativa da ocorrência dos grupos microbianos nas fissuras de dentes de humanos, em uma tentativa de colaborar para a resposta à esta pergunta.

MATERIAL E MÉTODOS

Alguns indivíduos com dentição permanente e possuindo molares e premolares hígidos, foram selecionados para a coleta de material sobre as fissuras destes dentes.

Após um período de 24 horas sem qualquer espécie de higiene oral, estes indivíduos fizeram um bochecho com revelador. A substância reveladora usada foi o Vermelho de Eritrosina a 0,25% e os bochechos duraram, aproximadamente, 30 segundos.

Depois de um novo bochecho com água, o material depositado em fissuras, então revelado, foi colhido com o auxílio de uma sonda exploradora.

O material foi colocado em papel alumínio previamente tarado e esterilizado, e após pesado, colocado em homogenizador contendo diluente, mantendo-se a proporção de 1 mg para 10 ml do diluente (diluição $10^{-4/g}$). A dispersão foi realizada em homogenizador de tecidos com o diluente salina fisiológica, seguida de várias diluições decimais e homogenização em agitador magnético *, por 1 minuto, até diluição $10^{-9/g}$.

A semeadura de 0,1 ml das diluições 10^{-7}, 10^{-8} e 10^{-9} do material, em placas de aar sangue, forneceu o número total de microrganismos viáveis.

O número de Veillonella foi determinado pela inoculação em profundidade, de 0,1 ml das diluições 10^{-4}, 10^{-5} e 10^{-6}, em placas de agar veillonella contendo 7,5 ug/ml de vancomicina.

* VEB Labortechnik Ilmenau, Ilmenau /Thür.

Em agar sangue adicionado de vancomicina (7,5 ug/ml) e estreptomicina (20 ug/ml), foi isolado Fusobacterium, identificando-se suas colônias como circulares, convexas e iridiscentes ao microscópio estereoscópico (aumento de 150x) tendo um facho de luz incidindo sobre as colônias.

Lactobacillus foram pesquisados pela semeadura do material, em profundidade, em meio SL (Rogosa SL) que é seletivo. As placas foram incubadas à temperatura de 37°C, por 3 dias.

As bactérias sintetizadoras de amilopectina (SAP) foram estabelecidas por contagens de placas de TSA (trypticase soy agar), semeadas em superfície. O meio continha glicose a 3%. As colônias contadas foram identificadas por uma coloração negra quando banhadas com uma solução de lugol.

Os microrganismos anaeróbios foram incubados à 37°C, em jarras do tipo F. O. P. A. (Louro et alii,[15] 1965), com 95% de nitrogênio e 5% de Gás Carbônico, por 4 dias.

A enumeração das colônias foi feita com contador de colônias do tipo Hellige.

As placas de agar sangue foram examinadas com auxílio de microscópio estereoscópico, estudando-se os aspectos morfológicos das colônias de características diferentes e feitos esfregaços para posterior coloração e observação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O material coletado foi facilmente identificado pelo revelador, vermelho de eritrosina, o qual não deve ter provocado alteração nenhuma sobre a viabilidade da microbiota conforme o trabalho de Oppermann et alii,[16] (No Prelo) — 1972.

Os meios de cultura utilizados para a presente análise são plenamente justificados por trabalhos anteriores como os de Araújo et alii,[2] (1966) e Schneider et alii,[17] (1969).

A contagem total de microrganismos viáveis (anaeróbios estritos e facultativos) e a dos grupos microbianos específicos, está expressa na tabela 1.

TABELA 1

DETERMINAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE MICRORGANISMOS VIÁVEIS E A OCORRÊNCIA DE GRUPOS MICROBIANOS ESPECÍFICOS DO MATERIAL DEPOSITADO EM FISSURAS DENTAIS DE HUMANOS

Microrganismo	nº de pacientes examinados	nº médio de microrganismos
Streptococcus	5	320×10^6
Veillonella	5	124×10^6
S. A. P. (§)	5	31×10^6
Fusobacterium	2	1×10^6
Lactobacillus	5	zero

(§) Microrganismos Sintetizadores de Amilopectina.

Com base na contagem específica e na sua distribuição percentual, como se deduz das tabelas 1 e 3, neste trabalho os resultados assemelham-se à distribuição de grupos microbianos de placa dental de superfícies lisas, de acordo com os dados de Stralfors (1950) e outros autores (Burnett e Scherp,[5] 1968), que estabeleceram 97% como sendo cocos e dentre estes, 70% de estreptococos. Encontramos os cocos perfazendo 91% e 58% destes, os estreptococos. A predominância de estreptococos foi seguida da ocorrência de Veillonella, fato verficado também por Schneider et alii,[17] (1969), quando examinaram placa dental de 21 pacientes.

TABELA 2

DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DA FLORA NORMAL ISOLADA DO DEPÓSITO EM FISSURAS DE TRÊS PACIENTES COM DENTIÇÃO PERMANENTE

Tipos de Microrganismos			
Gram-positivos (%)	Gram-negativos (%)	Cocos (%)	Bacilos (%)
68	32	91	9

A Tabela 2 mostra que no material depositado em fissuras houve predominância de cocos sobre os bacilos e, dos microrganismos isolados, observou-se predomínio dos Gram-positivos sobre os Gram-negativos.

Em relação as Veillonellae, sua presença foi de cerca de 1/3 dos estreptococos encontrados na placa dental. De acordo com Burnett e Scherp,[5] (1968) Veillonellae na boca compreendem de 1/4 a 1/2 dos estreptococos facultativos viáveis. Sendo a língua e a placa dental, provavelmente, os principais habitats destes microrganismos, é razoável o resultado encontrado, guardadas as proporções de microrganismos da placa dental para o total viável da cavidade oral.

TABELA 3

DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DOS GRUPOS MICROBIANOS PREDOMINANTES NO MATERIAL DEPOSITADO EM FISSURAS DE 3 PACIENTES

Grupo Microbiano	Nº de colônias	%
Cocos Gram-positivos	36	58
Cocos Gram-negativos	20	32
Bacilos Gram-positivos	6	10
Bacilos Gram-negativos	—	—

A tabela 3 mostra o número e a percentagem de microrganismos mais frequentes no material estudado. Observamos que houve predomínio de Cocos Gram-positivos sobre Gram-negativos e que não houve crescimento de gacilos Gram-negativos.

Os lactobacilos não foram encontrados em nenhum dos pacientes. Esta ausência poderia ser uma consequência lógica do tipo de material e do local onde foi coletado, pois, como foram feitos raspados de dentes hígidos, das zonas das fissuras e não havendo lesão visível de cáries nestas áreas, e ainda, sendo os lactobacilos relacionados com atividade cariosa, o mais provável seria o resultado encontrado. Estes concordaram com as observações de Gibbons et alii,[8] (1964), que não encontraram lactobacilos na placa dental de cinco pacientes examinados. Concordaram também com os resultados de Barbosa e Araújo,[3] (1968) que procurando determinar o nicho de lactobacilos na boca, estudaram placa dental depositada sobre superfícies não cariadas de 21 pacientes, relatando que apenas um caso apresen-

tou lactobacilos, embora o microrganismo fosse iseolado da saliva e da língua de 18 dos pacientes examinados.

Os bacilos Gram-positivos, conforme a tabela 3, aparecem em nível abaixo do encontrado em placas de superfícies lisas, (Gibbons et alii[8], 1964) enquanto que os Gram-negativos, não foram registrados, o que nos parece também ser aceitável, pois estes não são frequentes em placas dento-gengivais (Burnett e Scherp,[5] 1968).

Fato que nos chamou a atenção (tabela 1), foi a baixa contagem de germes SAP (sintetizadores de amilopectina), que por exemplo, em relação aos estreptococos, atingiram perto de 10%, o que é muito pouco face aos dados encontrados por Gibbons e Socransky,[6] (1962), Berman e Gibbons,[4] (1966) e Tovo,[18] (1967) que demonstraram possuir a placa, altas contagens destes microrganismos. Isto pode ser especulado como sendo proveniente de fatores como o local do material coletado, da ausência de áreas cariadas nestes locais e ainda por examinarmos um número restrito de casos.

Deve ser salientado, entretanto, que este trabalho ora apresentado, foi prejudicado devido à grande dificuldade que encontramos em selecionar pacientes que tivessem prémolares e molares hígidos. Dos cinco pacientes examinados, apenas de três foram pescadas colônias de características morfológicas diferentes nas placas de agar sangue semeadas com 0,1 ml das diluições mais elevadas do material, com o objetivo de se conhecer os grupos microbianos predominantes. É possível, pois, que se estudando maior número de casos apareçam diferenças mais acentuadas para a distribuição dos grupos microbianos mais frequentes no material depositado em fissuras. Talvez a percentagem de microrganismos por nós encontrada, seja artificial e decorrente da análise de apenas cinco indivíduos. No entanto, as dificuldades encontradas na seleção de pacientes justificam o número reduzido de casos apresentados.

SYNOPSYS

To analyze the groups of microrganisms present on fissures of caries free molars of 5 patients after 24h with no oral hygiene, it was collected the material deposited on its fissures after using erithrosin 0,25% as a disclosing agent. The material was cultivated in blood agar, for analysys of viable microrganisms, and in Veillonella agar, SL agar, TSA and McCarthy medium for the study respectevelly of Veillonella, Lactobacillus, iodophilic polysaccharides microrganisms and Fusobacterium.

The results of the viable microrganisms showed 58% of Gram positive coccus, 32% of Gram negative coccus, 10% of Gram positive rods. It was not found Gram negative rods.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAUJO, W.C. & MAC DONALD, J.B. — The gingival creavice microbiota in five preschool children. **Arch. Oral Biol.,** 9:227-228, 1964.
2. ARAUJO, W.C. de et alii. — Rendimento dos meios seletivos para bactérias do gênero fusobacterium. **Ci. Cult.,** 18:186-187, 1966.
3. BARBOSA, M.T. & ARAUJO, W.C. — Ocorrência de Lactobacilus nos nichos microbianos da cavidade da boca. **Arq. Cent. Est. Fac. Odont.,** Belo Horionte, 5:115-122, 1968.
4. BERMAN, K.S. & GIBBONS, R.J. — Iodophilic polysacharide synthesis by human and rodent oral bacteria. **Arch. Oral Biol.,** 11:533-542, 1966.
5. BURNETT, G.W. & SCHERP, H.W. — **Oral microbiology and infectiou disease.** 2ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1968, 100 p.(p. 371).
6. GIBBONS, R.J. & SOCRANSKY, S.S. — Intracellular polysaccharide sterage by organisms in dental plaque. **Arch. Oral Biol.,** 7:73-80, 1962.
7. GIBBONS, R.J. et alii. — The microbiota of the gengival crevice area of man: II The predominant cultivable organisms. **Arch. Oral Biol.,** 8:281-289, 1963.
8. GIBBONS, R.J. et alii. — Studies of the predominant cultivable microbiota of dental plaque. **Arch. Oral Biol.,** 9:365-370, 1964.
9. GORDON JR., D.F. & GIBBONS, R.J. — Studies of the predominant cultivable microorganisms from the human tongue. **Arch. Oral Biol.,** 11:627-632, 1966.
10. KEYES, P.H. — Research in dental caries. **J.A.D.A.,** 76:1357-1373, 1968.
11. KRASSE, B. — The proportional distribuition of Streptococus Salivarius and other streptococci in various parts of the mouth. **Odont. Rev.,** 5:203-211, 1954.
12. LARSON, R.H. — Response of Harvard caries-susceptible and caries resistant rats to a severe cariogenic challenge. **J. Dent. Res.,** 44: 1402-1406, 1965.
13. LARSON, R.H. & SIMS, M.E. — Genetic and environmental influence on dental caries in the Osborne-Mendel and the NIH black rate. **Arch. Oral Biol.** 10:633-638, 1965.
14. LARSON, R.H. & GOSS, B.J. — Diet as a limiting factor in the transmissibility of caries activity between rats of different strains. **Arch. Oral Biol.,** 12:1085-1094, 1967.

15. LOURO Fº, P.P. et alii. — Jarra F.O.P.A. de Anaerobiose. **Arq. Cent. Estud. Fac. Odontol.**, Belo Horizonte, 215-227, 1965.
16. OPPERMANN, R.V. et alii. — Influência do uso de reveladores na viabilidade de microorganismos da placa dental. **R. Fac. Odont. P.A., 12; 1972.**
17. SCHNEIDER SANTOS, J.O. et alii — Estudo sobre a microbiota da placa dental de pacientes com dentição decídua. **R. Bras. Pesq. Med. Biol., 2**(4):226-234, 1969.
18. TOVO, L.C. — Lactobacilos e germes sintetizadores de amilopectina na saliva e placa dental. **R. Fac. Odont. P.A., 10/11:41-57, 1968/1969.**