

CRISTIANE YUMI KOGA

**QUANTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA  
CARIOGÊNICA E FÚNGICA E DE ANTICORPOS  
ANTI-*CANDIDA* E ANTI-*STREPTOCOCCUS MUTANS*  
NA SALIVA DE PACIENTES RESPIRADORES  
BUCAIS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Biologia e Patologia Buco-Dental, Faculdade  
de Odontologia de Piracicaba, Universidade  
Estadual de Campinas, para obtenção do Título  
de Mestre em Ciências.

Piracicaba  
1995

*Este Exemplo foi devidamente corrigido conforme resolução CCPE/USP/85 Piracicaba, 16 outubro 1995*

**CRISTIANE YUMI KOGA, C.D.**

**QUANTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA CARIOGÊNICA E FÚNGICA E DE ANTICORPOS ANTI-CANDIDA E ANTI-STREPTOCOCCUS MUTANS NA SALIVA DE PACIENTES RESPIRADORES BUCAIS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências. Área de concentração em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge  
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	
	T/UNICAMP
	K822q
	E.
	26102
	433195
	C   D   X
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	18/11/95
N.º CPD	

CM-00079622-9

Koga, Cristiane Yumi

K822q Quantificação da microbiota cariogênica e fúngica e de anticorpos anti-"Candida" e anti-"Streptococcus mutans" na saliva de pacientes respiradores bucais / Cristiane Yumi Koga. - Piracicaba, SP : [s.n.], 1995.  
125f. :il.

Orientador: Antonio Olavo Cardoso Jorge.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Cáries dentárias. 2. Respiração - boca. 3. "Streptococcus mutans". 4. "Candida albicans". I. Jorge, Antonio Olavo Cardoso. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

19.CDD - 617.67  
- 612.21

Índices para Catálogo Sistemático

1. Cáries dentárias 617.67  
2. Respiração - boca 612.21

**DATA DA APROVAÇÃO** : 22 de junho de 1995.

**BANCA EXAMINADORA :**

PROFa. DRa. CARMELINDA SCHIMIDT UNTERKIRCHER -



---

PROF. DR. OSLEI PAES DE ALMEIDA



---

PROF. DR ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE



---

Aos meus pais TSUYAKO e BENITO e  
às minhas irmãs LUCIANE e MIRIAN  
cujo espírito de família sempre foi um alicerce  
seguro para as minhas realizações...

À Antonio Carlos pelo carinho, dedicação  
e incentivo...

Ao Prof. Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge,  
com toda a admiração, meus sinceros  
agradecimentos pela orientação segura e pela  
confiança em nós depositada.

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP, pela oportunidade de frequentar o Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental.

Ao Prof. Dr. Sergio Roberto Peres Line, coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP.

À Profa Dra. Neide Querido Almeida, professora aposentada da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, pelo incentivo e a oportunidade de iniciar as atividades científicas.

À Profa. Carmelinda Schmidt Unterkircher, da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, pela orientação na realização da reação ELISA.

À Profa. Dra. Lúcia Teramoto, da Disciplina de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, pela ajuda na seleção de pacientes respiradores bucais.

Ao Prof. Dr. Maximiliano Piero Neisser, da Disciplina de Prótese Total da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, pela realização das fotos clínicas.

À Profa. Dra. Sonia Vieira, da Disciplina de Bioestatística do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP, pela orientação na realização da análise estatística.

À Srta. Helena Watanabe, fonoaudióloga da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, pela importante colaboração na seleção de pacientes e orientação nos tópicos relacionados à Fonoaudiologia.

À Sra. Clélia Aparecida de Paiva Martins, técnica do laboratório da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, pela ajuda indispensável durante as realizações das técnicas laboratoriais.

À Sra. Leila Novaes, bibliotecária da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, pela ajuda na conferência das referências bibliográficas e normalização.

Às Sras. Terezinha Sant'Ana Oliveira Costa e Terezinha de Fátima Arantes de Mello, secretárias do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, pela colaboração na confecção de gráficos e tabelas.

Às amigas Dras. Lucimeire Otani, Claudia Ota e Cássia Hiromi Kague pelo incentivo e amizade durante a realização deste trabalho.

Aos colegas e professores do Curso de Pós-graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP.

À Diretoria da EEPSPG "Ângelo Siqueira Afonso", pela permissão de coletar material de estudo de seus alunos, os quais fizeram parte do grupo controle.

Aos voluntários, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

À todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado com o auxílio  
financeiro da FAPESP - Processo 94/3542-6

Bolsa de Mestrado - CNPq (Conselho Nacional de  
Desenvolvimento Científico e Tecnológico) -  
Processo 13253/94-5

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	19
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	21
2.1	Síndrome do Respirador bucal.....	21
2.2	Testes microbiológicos de atividade de cárie .....	23
2.3	Presença de leveduras do gênero <i>Candida</i> na boca .....	28
2.4	Presença de anticorpos anti- <i>Streptococcus mutans</i> e anti- <i>Candida</i> e na saliva .....	30
3	PROPOSIÇÃO .....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	38
4.1	Determinação do fluxo salivar .....	42
4.2	Determinação da capacidade tampão da saliva .....	43
4.3	Teste de Snyder .....	44
4.4	Contagem de estreptococos do grupo <i>mutans</i> na saliva .....	45
4.5	Contagem de lactobacilos na saliva .....	45
4.6	Contagem de leveduras na saliva .....	46
4.7	Isolamento e identificação de leveduras na saliva .....	47
4.7.1	Formação de tubo germinativo .....	47
4.7.2	Produção de hifas/pseudohifas e clamidósporos .....	48
4.7.3	Fermentação de carboidratos .....	49
4.7.4	Assimilação de carboidratos .....	49
4.7.5	Interpretação dos resultados .....	50

4.8	Pesquisa de anticorpos anti- <i>Candida</i> e anti- <i>Streptococcus mutans</i> na saliva .....	52
4.8.1	Preparo do antígeno .....	52
4.8.2	Técnica ELISA .....	52
4.9	Análise estatística .....	54
5	RESULTADOS .....	56
6	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	72
7	CONCLUSÕES .....	84
8	ANEXOS .....	86
9	SUMMARY .....	102
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	104

## LISTAS

### LISTA DE ILUSTRAÇÕES:

FIGURA 1 - Paciente com SRB (vista frontal) .....	39
FIGURA 2 - Paciente com SRB (vista frontal aproximada) .....	40
FIGURA 3 - Paciente com SRB (perfil) .....	41
TABELA 1 - Interpretação da determinação do fluxo salivar ..... e escores atribuídos, de acordo com a quantidade de saliva obtida (ml) por minuto.	43
TABELA 2 - Interpretação da capacidade tampão da saliva e ..... escores atribuídos.	44
TABELA 3 - Interpretação do teste de Snyder. ....	44
TABELA 4 - Correlação do número de Lactobacilos com a ..... suposta atividade de cárie e os respectivos escores atribuídos.	46
TABELA 5 - Correlação do número de UFC/ml de leveduras na ..... saliva com a atividade de cárie e escores atribuídos.	47
TABELA 6 - Características bioquímicas de microcultivo e ..... formação tubo germinativo de espécies do gênero <i>Candida</i> .	48
FIGURA 5 - Esquema dos procedimentos realizados com a saliva ..... coletada de cada paciente.	55
TABELA 7 - Número e porcentagem de pacientes nas respectivas ..... interpretações do teste de Snyder, contagem de lacto- bacilos, estreptococos do grupo <i>mutans</i> e de leveduras nos grupo controle (n=30), respirador bucal (n=30) e tratado (n=25).	58

TABELA 8 - Média e desvio-padrão do logaritmo do número de UFC/ml de saliva obtidas nas contagens de lactobacilos, estreptococos do grupo <i>mutans</i> e leveduras no grupo controle, respirador bucal e tratado.	59
TABELA 9 - Número de pacientes e as respectivas interpretações dos testes salivares de atividade de cárie nos grupos controle, respirador bucal e tratado.	60
TABELA 10 - Médias e desvio-padrão dos escores atribuídos para o teste de Snyder, do fluxo salivar e os pH obtidos nos testes de capacidade tampão da saliva, nos grupos controle, respirador bucal e tratado.	61
TABELA 11 - Número da soma de escores obtido para cada grupo, médias e desvio-padrão para a soma dos escores.	62
TABELA 12 - Número e percentual de pacientes que apresentaram leveduras na cavidade bucal nos grupos estudados.	63
TABELA 13 - Espécies de leveduras isoladas e identificadas das amostras de saliva.	63
TABELA 14 - Média, desvio-padrão e mediana dos valores de DO obtidos para IgA, IgG e IgM anti- <i>Streptococcus mutans</i> .	64
TABELA 15 - Média, desvio-padrão e mediana dos valores de DO obtidos para IgA, IgG e IgM anti- <i>Candida</i> .	65
TABELA 16 - Média e desvio-padrão para porcentagem de aumento das DO para anticorpos anti- <i>Streptococcus mutans</i> .	65
TABELA 17 - Média e desvio-padrão para porcentagem de aumento das DO para anticorpos anti <i>Candida</i> .	65
FIGURA 4 - Níveis salivares de imunoglobulinas anti- <i>Candida</i> das classes IgG, IgA e IgM nos pacientes com SRB.	68
FIGURA 5 - Níveis salivares de imunoglobulinas anti- <i>Candida</i> das classes IgG, IgA e IgM nos pacientes do grupo tratado.	69

FIGURA 6 - Níveis salivares de imunoglobulinas anti-*Streptococcus* ..... 70  
*mutans* das classes IgG, IgA e IgM nos pacientes com SRB.

FIGURA 7 - Níveis salivares de imunoglobulinas anti-*Streptococcus* ..... 71  
*mutans* das classes IgG, IgA e IgM nos pacientes do grupo tratado.

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

ml	- mililitro
mm	- milímetro
mg	- miligrama
g	- grama
r.p.m.	- rotações por minuto
$\mu$ g	- micrograma
pH	- potencial de hidrogênio
mM	- milimol
M	- mol
$\mu$ l	- microlitro
DO	- densidades ópticas
UFC/ml	- Unidades formadoras de colônia por mililitro.

**LISTA DE NOTAÇÕES:**

% - percentagem

°C - grau Celsius

KOGA, C.Y. Quantificação da microbiota cariogênica e fúngica e de anticorpos anti-*Candida* e anti-*Streptococcus mutans* na saliva de pacientes respiradores bucais. Piracicaba, 1995. 125p. Tese (Mestrado em Biologia e Patologia Buco-Dental) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

## RESUMO

A síndrome do respirador bucal (SRB) produz alterações no meio bucal e na microbiota, aumentando a suscetibilidade à cárie e outras infecções. O objetivo deste trabalho foi comparar a microbiota cariogênica e fúngica e quantificar imunoglobulinas anti-*Streptococcus mutans* e anti-*Candida* na saliva de crianças normais e com SRB antes e após o tratamento. Foram utilizadas 30 crianças normais, 30 com SRB e 25 tratadas, nas quais foram realizadas contagens de lactobacilos, estreptococos do grupo *mutans*, leveduras, teste de Snyder e testes salivares (fluxo salivar e capacidade tampão). Também foram quantificadas imunoglobulinas anti-*Candida* e anti-*Streptococcus mutans* (IgG, IgM e IgA) na saliva através da técnica ELISA. A média da soma de escores para os respiradores bucais foi maior e significativa em relação aos demais grupos. O número de leveduras do gênero *Candida* também foi maior nos pacientes respiradores bucais. O nível de IgA e IgM anti-*Streptococcus mutans* e IgA e IgM anti-*Candida* foi menor no grupo respirador bucal. Os

resultados indicam que medidas preventivas devam ser realizadas em pacientes com SRB para prevenção de cárie e infecções fúngicas.

Palavras-chave: Respiração bucal; testes de atividade de cárie dentária;

*Candida*; imunoglobulinas; *Streptococcus mutans*.

## 1 INTRODUÇÃO

Respirador bucal é o indivíduo que respira através da boca em lugar de fazê-lo pelo nariz (Segovia<sup>106</sup>, 1977). Clinicamente, pacientes com Síndrome do Respirador Bucal (SRB) apresentam boca aberta, queda da mandíbula, musculatura dos lábios geralmente frouxa, lábio inferior evertido, musculatura masseterina e bucinadora estirada, protrusão incisal, olhar divergente ou convergente perdido no horizonte, desatenção, capacidade auditiva diminuída e a língua apoiada no soalho da boca (Aragão<sup>4</sup>, 1986). Estas características podem causar alterações no meio bucal e na microbiota, produzindo possível seleção de microrganismos cariogênicos na placa bacteriana, o que poderá aumentar a suscetibilidade à cárie.

A SRB também interfere com a presença de diferentes espécies do gênero *Candida* que colonizam a cavidade bucal (Koga<sup>58</sup> et al., 1993). Apesar de serem consideradas leveduras residentes, a presença de *Candida*, e principalmente da espécie *C. albicans* podem causar infecções quando fatores predisponentes estão presentes (Olsen e Stenderup<sup>85</sup>, 1990; Stenderup<sup>113</sup>, 1990).

Pacientes com SRB geralmente apresentam maior predisposição e severidade às gengivites, o que é correlacionado com o ressecamento de áreas gengivais (Jacobson & Linder-Aronson<sup>42</sup>, 1972; Riar et al.<sup>92</sup>, 1970; Eslami & Sodeghi<sup>26</sup>, 1975; Novaes e Vigorito<sup>81</sup>, 1993).

Fabris et al.<sup>27</sup> (1968), utilizando o teste de Snyder, observaram maior atividade de cárie em pacientes respiradores bucais. Como existem poucos estudos correlacionando a quantidade de microrganismos cariogênicos e a presença de leveduras em pacientes com SRB, o objetivo deste trabalho foi estudar a microbiota cariogênica, a presença de leveduras do gênero *Candida* na boca, e analisar a presença de anticorpos anti-*Streptococcus mutans* e anti-*Candida* na saliva destes pacientes antes e após o tratamento da SRB, comparando-os com indivíduos normais.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Síndrome do respirador bucal

A função respiratória geralmente se faz pela via nasal, porém, frente a uma somatória de fatores predisponentes, pode se instalar uma respiração por via bucal (Segovia<sup>106</sup>, 1977).

Riar et al.<sup>92</sup> (1970) classificam as causas da respiração bucal em: a) obstrução naso-faríngea devido a deformidades nasais, irritações ou espessamento da mucosa nasal, patologias ósseas ou adenóides aumentadas; b) hábitos bucais como sucção digital, morder os lábios ou roer unhas; c) defeitos de desenvolvimento, como macroglossia ou lábio superior curto; d) função muscular alterada como no hipertireoidismo ou disfunções nervosas; e) má-oclusão em classe II subdivisão 1; f) distúrbios psicossomáticos, cardíacos ou respiratórios.

Segovia<sup>106</sup> (1977) cita as adenóides como causa mais comum da respiração bucal. Num estudo realizado com 500 pacientes, 19% eram respiradores bucais, dos quais 13% apresentavam adenóides e 6% alergias, rinites, sinusites, desvio de septo e outras causas. Novaes & Vigorito<sup>81</sup> (1993) salientam ainda rinites alérgicas e pólipos nasais dentre as causas mais comuns.

Além dos fatores obstrutivos, Limme<sup>71</sup> (1993) cita outras causas que podem explicar o desenvolvimento da respiração bucal: má formação da face (síndrome de Binder, microrinodisplasia de Bimler e

síndrome de Apert e Crouzon), alterações e desvios da língua (síndrome de Robin, macroglossia e anquiloglossia) e problemas de fendas labiais.

O aleitamento por mamadeira com furo inadequado, principalmente além de dois anos de idade, sucção digital ou de chupetas não ortodônticas e manutenção de dieta pastosa pode provocar hipotonia dos músculos labiais e elevadores da mandíbula, podendo funcionar como fatores predisponentes coadjuvantes (Kudo et al.<sup>66</sup>, 1990). Aragão<sup>4</sup> (1986) verificou que a maioria dos respiradores bucais estudados não tinham sido amamentados ao seio materno e, se o foram, foi por tempo insuficiente para estabelecimento dos padrões de crescimento e desenvolvimento facial.

Instalada a respiração bucal, o paciente passa a apresentar sinais clínicos característicos que em conjunto são denominados de Síndrome do Respirador Bucal (SRB). Tais sinais são: boca aberta com consequente queda da mandíbula, musculatura labial geralmente frouxa e lábio inferior na maioria das vezes evertido, musculatura bucinadora e masseterina estirada com consequente protrusão incisal, olhar divergente ou convergente, perdido no horizonte, desatenção e quase sempre capacidade auditiva diminuída devido ao acúmulo de muco na tuba auditiva e língua apoiada no soalho bucal (Aragão<sup>4</sup>, 1986). Segovia<sup>106</sup> (1977) salienta ainda mordida cruzada posterior, cabeça inclinada para trás e rosto largo.

A persistência da respiração bucal poderá levar a alterações musculares e ósseas principalmente durante a fase de crescimento. Como consequências diretas e indiretas da respiração bucal podemos encontrar: modificação no padrão de crescimento da face, erupção dentária assincrônica, formação de pólipos e vegetações adenoideanas, complicações pulmonares devido a entrada de ar diretamente pela boca, otite catarral,

alterações na forma do nariz, olheiras, mordida aberta anterior, mordida cruzada posterior, palato ogival, lábios, língua e bochechas hipotônicos, crescimento facial alterado e alterações na fala (Poetsch<sup>90</sup>, 1968; Aragão<sup>4</sup>, 1986; Fuga<sup>33</sup>, 1990; Marchesan<sup>75</sup>, 1993; Limme<sup>70</sup>, 1993).

Alterações sistêmicas importantes são citadas por Marchesan<sup>75</sup> (1993): tórax retruído, coluna cervical vertida para a frente, pontas dos ombros para a frente, omoplatas salientes (em forma alar), abdômen saliente com musculatura flácida, postura de pernas e pés alteradas, rendimento escolar diminuído, dinâmica corporal alterada com agitação e inapetência, e crescimento físico diminuído.

Novaes & Vigorito<sup>81</sup> (1993) citam ainda alterações na respiração que se apresenta atáxica com modificações no ritmo e amplitude. Como consequência menor volume de ar é inspirado, o que provocaria hipóxia, resultando numa menor capacidade intelectual e de concentração.

Forsberg & Tedestam<sup>32</sup> (1993) relatam uma susceptibilidade aumentada às injúrias dentárias traumáticas, sobretudo nos dentes anteriores.

## **2.2 Testes microbiológicos de atividade de cárie**

Segundo Weyne<sup>128</sup> (1986), o diagnóstico da atividade de cárie foi baseado durante muitos anos, exclusivamente no conhecimento do número total de dentes ou superfícies apresentando cáries. Esta análise, porém, não acompanha o caráter dinâmico do processo de cárie, não permitindo que novas cavidades sejam efetivamente evitadas.

Visto que a microbiota é um dos fatores essenciais na etiologia da cárie (Keyes<sup>52</sup>, 1969), as tentativas na obtenção de um bom método para se prever o risco de cárie tem se voltado cada vez mais para o uso dos testes microbiológicos (Alaluusua<sup>1</sup>, 1993).

O objetivo principal destes testes é identificar indivíduos que necessitem de medidas específicas para reduzir a velocidade de progressão da cárie. Vários autores (Koch<sup>57</sup>, 1988; Crall et al.<sup>20</sup>, 1990; Brathall & Carlsson<sup>9</sup>, 1988) alertam para a importância da determinação precoce do alto risco de cárie. Tal conhecimento é extremamente importante para o clínico ou em saúde pública, pois medidas preventivas mais intensas poderiam se concentrar apenas em indivíduos de alto risco, diminuindo o custo e aumentando a eficiência de programas de prevenção (Fédération Dentaire Internationale<sup>28</sup>, 1988).

Outro fator a ser considerado é a motivação, pois a demonstração ao paciente dos microrganismos relacionados à cárie, parece ser mais efetivo que a informação isolada de novas lesões (Alaluusua<sup>1</sup>, 1993). Brathall & Carlsson<sup>9</sup> (1988) afirmam existir confiabilidade nestes testes em diagnosticar a probabilidade de progressão de novas lesões.

Vários testes foram propostos na literatura, visando cumprir os requisitos propostos por Snyder<sup>109</sup>, em 1951: máxima correlação com o estado clínico do paciente e com o aumento no número de novas lesões de cárie, ser acurado quanto à duplicação dos resultados, ser de simples execução, requerer o mínimo de procedimentos e equipamentos, não ser dispendioso e apresentar resultados rapidamente. O primeiro e mais empregado método bacteriológico para medir atividade de cárie foi a determinação do número de lactobacilos em saliva estimulada. Rodrigues<sup>94</sup>,

em 1922, propôs um meio para lactobacilos bucais a base de soro de cavalo, que demonstrava entretanto pouca seletividade. A adição de suco de tomate a um meio base de ágar aumentou a seletividade para lactobacilos, entretanto foi Rogosa<sup>95</sup> (1951) que desenvolveu um meio seletivo que suplantou os demais e é usado até hoje, graças à adição de um agente tensioativo (tween 80) e uma mistura de sais especiais.

Os lactobacilos foram os primeiros microrganismos a serem considerados cariogênicos (Van Houte<sup>124</sup>, 1994) porém, atualmente se considera que não são iniciadores, mas sim envolvidos na progressão do processo cariioso (Anderson<sup>3</sup>, 1993). Além disso estão diretamente correlacionados com a ingestão alta e frequente de carboidratos. Assim a contagem de *Lactobacillus* pode ser usada tanto para a avaliação do risco de cárie como para avaliar o efeito das alterações dietéticas (Van Houte<sup>122</sup>, 1981; Crossner<sup>21</sup>, 1981; Krasse<sup>64</sup>, 1986; Alaluusua<sup>1</sup>, 1993; Klock & Krasse<sup>55</sup>, 1978).

Em 1940, Snyder<sup>110</sup> propôs método mais simplificado para medir atividade de cárie, baseando-se na rapidez de formação de ácidos pelas bactéria bucais. Demonstrou-se uma relação de proporcionalidade entre a formação destes ácidos e o número inicial de lactobacilos presentes na amostra em teste. Segundo Sims<sup>107</sup> (1970), na realidade apenas os lactobacilos não são inibidos pela acidez do meio de Snyder (pH 4.8-5.1) e são capazes de produzir ácidos sob estas condições. Alguns trabalhos demonstram a correlação entre o teste positivo e a atividade clínica de cárie; a melhor concordância parece entretanto ser entre o teste negativo e a ausência de atividade de cárie (Sims<sup>107</sup>, 1970). Outros autores afirmam

entretanto que o teste de Snyder não pode prever com exatidão a extensão da expectativa de cárie (Socransky<sup>111</sup>, 1968).

O importante papel etiológico dos estreptococos do grupo *mutans* no processo de cárie tem sido amplamente estudado por vários autores (Hamada & Slade<sup>38</sup>, 1980; Zickert et al.<sup>132</sup>, 1982; Togelius & Brathall<sup>119</sup>, 1982; Germaine<sup>34</sup>, 1984; Köhler et al.<sup>60</sup>, 1984; Loesche<sup>72</sup>, 1986; Köhler & Bjarnason<sup>61</sup>, 1987; Köhler et al.<sup>59</sup>, 1988; Emilson et al.<sup>23</sup>, 1989), sendo a contagem desse grupo de microrganismos freqüentemente utilizada para o diagnóstico e propósitos predictivos em cariologia (Stecksén-Blicks<sup>112</sup>, 1985; Bowen<sup>8</sup>, 1986; Jordan<sup>45</sup>, 1986; Pienihäkkinen<sup>88</sup>, 1987; Krasse<sup>63</sup>, 1988; Schlagenhaut & Rosendhal<sup>105</sup>, 1990; Klock & Krasse<sup>35</sup>, 1978). A relação entre alta contagem de *S. mutans* e alta atividade de cárie tem sido comprovada por vários autores (Klock & Krasse<sup>34</sup>, 1979; Krasse<sup>65</sup>, 1986; Zickert<sup>131</sup>, 1982; Newbrun<sup>80</sup>, 1992; Alaluusua<sup>1</sup>, 1993; Anderson<sup>3</sup>, 1993).

Köhler et al.<sup>59</sup> (1988) verificaram ainda correlação entre a colonização precoce da cavidade bucal por *S. mutans* e o aumento na prevalência de cárie em crianças. O nível de *S. mutans* também é bastante sensível à dieta contendo carboidratos, deste modo, a contagem dos mesmos é válida na avaliação dietética (Van Houte<sup>123</sup>, 1993).

O meio de cultura mais utilizado para o isolamento de *S. mutans* é o ágar Mitis-Salivarius acrescido de 20% de sacarose e 0,2 unidades de bacitracina por mililitro de meio (MSB) (Gold et al.<sup>35</sup>, 1973). Por outro lado, Tanzer et al.<sup>115</sup> (1984) não consideram este meio ideal para testes diagnósticos, pois não pode ser estocado por longos períodos, é parcialmente seletivo e subestima a presença de estreptococos do grupo

*mutans*. Segundo Kimmel & Tinanoff<sup>33</sup> (1991), o MSB leva a uma superestimação do número real de *mutans*, pois não suprime os estreptococos não-*mutans* podendo levar a resultados falsos positivos.

Segundo Samaranayake et al.<sup>101</sup> (1986), a *Candida albicans* possui características acidogênicas e heterofermentativas, particularmente sob condições ricas em carboidratos, podendo participar deste modo do processo da cárie. Pienihäkkinen<sup>89</sup> (1988) utilizou a contagem de leveduras em combinação com a capacidade tampão da saliva e a contagem de lactobacilos e concluiu que este conjunto de variáveis tinham capacidade de distinguir indivíduos com alto e baixo incremento de cárie. Russel et al.<sup>98</sup> (1991) também associaram contagens de fungos com atividade de cárie em estudos com jovens na Escócia.

Testes de capacidade tampão da saliva e mensuração do fluxo salivar também são utilizados para avaliar a atividade de cárie (Pienihäkkinen<sup>88</sup>, 1987; Schlagenhaut & Rosendhal<sup>105</sup>, 1990; Tuki-Kulmala e Tenovuo<sup>121</sup>, 1993). Segundo Mandel<sup>74</sup> (1987) a saliva tem papel extremamente importante sobre a acidez da placa bacteriana, envolvendo a sua capacidade tampão e a remoção de ácidos da placa. Uma diminuição do fluxo salivar por longo período (xerostomia), leva a cáries rampantes o que indica que mudanças no fluxo salivar podem levar a alterações fundamentais na composição bacteriana da placa, podendo interferir no potencial cariogênico (Brown<sup>10</sup>, 1975).

### 2.3 Presença de leveduras do gênero *Candida* na boca

As leveduras são de ocorrência comum na cavidade bucal de indivíduos saudáveis (Stenderup<sup>113</sup>, 1990). A presença de espécies do gênero *Candida* na cavidade bucal de indivíduos saudáveis varia de 35 a 37% (Burford-Mason et al.<sup>14</sup>, 1988, Wray et al.<sup>130</sup>, 1990) até 40 a 60% (Marsh & Martin<sup>76</sup>, 1992). *C. albicans* é a espécie prevalente na microbiota bucal, constituindo 60 a 70% do total de isoladas, seguido pela *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

*C. albicans* é isolada da boca de 5 a 7% das crianças nas primeiras horas após o nascimento, estando presente em 14,21% após 1 semana (Russel & Lay<sup>97</sup>, 1973; Lay & Russel<sup>67</sup>, 1977) e chegando ao pico ao redor dos 2 meses de idade. Berdicevsky et al.<sup>6</sup> (1984) relataram a presença de *Candida* em 49% das crianças de 3 a 5,5 anos e em 65% nas de 6 a 12 anos.

*C. albicans* não está distribuída uniformemente na boca; o dorso da língua parece ser o reservatório primário do fungo, a partir do qual o restante da mucosa, superfícies dos dentes, placa bacteriana e saliva tornam-se colonizados secundariamente (Arendorf & Walker<sup>5</sup>, 1980).

Ainda não está claro porque alguns pacientes são portadores de *Candida* e outros não, entretanto fatores nutricionais, interações com a microbiota bacteriana e a presença de anticorpos específicos na saliva parecem ser relevantes (Stenderup<sup>113</sup>, 1990).

Em determinados indivíduos e em situações específicas, microrganismos do gênero *Candida* podem produzir candidoses bucais (Holmstrup & Axéll<sup>40</sup>, 1990). A transformação da forma de comensal para

parasitária deve-se a fatores microbianos, ambientais e individuais (Samaranayake & MacFarlane<sup>100</sup>, 1990). Oksala<sup>82</sup> (1990) correlaciona fatores predisponentes sistêmicos e locais com infecções por *Candida*.

Dentre os fatores predisponentes mais comuns encontram-se: imunossupressão, xerostomia, alterações endócrinas, discrasia sanguíneas, uso de aparelhos ortodônticos, fatores mecânicos e iatrogênicos (Heindahl & Nord<sup>39</sup>, 1989; Oksala<sup>82</sup>, 1990; Stenderup<sup>113</sup>, 1990; Budtz-Jørgensen<sup>11,12</sup>, 1990; Samaranayake & MacFarlane<sup>100</sup>, 1990; Wray<sup>130</sup>, 1990; Iacopino & Wathen<sup>41</sup>, 1992; Jorge<sup>47,46</sup>, 1986, 1991; Jorge et al.<sup>49,48</sup>, 1987, 1993 a e b; Coogan et al.<sup>19</sup>, 1994).

Mudanças qualitativas no pH, concentração de glicose na saliva e quantidade de carboidratos na dieta também são fatores predisponentes locais à instalação de *Candida* na cavidade bucal. Samaranayake et al.<sup>101</sup> (1986) observaram melhor crescimento de *C. albicans* e *C. glabrata* em saliva humana, quando se adicionava glicose à mesma. O crescimento era acompanhado por declínio rápido do pH de 7.5 para 3.2 em 48 horas, demonstrando o metabolismo acidogênico destes microrganismos. Por outro lado, na ausência de glicose, parece não haver crescimento de *Candida* em saliva coletada de indivíduos saudáveis (Samaranayake<sup>99</sup>, 1984).

A patogenicidade das espécies de *Candida* ocorre pela invasão tecidual, o que induz a estados de hipersensibilidade, e pela produção de toxinas (Budtz-Jørgensen<sup>11</sup>, 1990). Outro fator de virulência é a capacidade de aderência à mucosa da cavidade bucal, que provavelmente ocorre pela interação entre adesinas da parede do fungo com receptores das células epiteliais bucais (Olsen<sup>84</sup>, 1990). A aderência é influenciada de um lado por

fatores inerentes às leveduras como a não expressão de adesinas no fenótipo, a presença de tubo germinativo e a produção de polímeros extracelulares; e, de outro lado, por fatores do hospedeiro como: hormônios sexuais, presença de fibrina, fibrinogênio, viabilidade e tamanho das células de descamação da mucosa, estado dos tecidos bucais, etc (Olsen<sup>83</sup>, 1990).

A SRB produz evidentes alterações na cavidade bucal (Marchesan<sup>75</sup>, 1993), o que deve interferir na colonização, permanência e patogenicidade das amostras de *Candida* na boca destes pacientes. Koga et al.<sup>58</sup> (1993) encontraram diferenças nas espécies de *Candida* presentes na cavidade bucal de pacientes com SRB, em relação a crianças controle.

#### **2.4 Presença de anticorpos anti-*Streptococcus mutans* e anti-*Candida* na saliva**

Os tecidos moles e duros da cavidade bucal estão sob a proteção de dois tipos de fatores imunes: inespecífico e específico (Thylstrup & Fejerskov<sup>118</sup>, 1988). O sistema inespecífico é constituído por diversas proteínas ou glicoproteínas salivares tais como lactoperoxidase, lactoferrina e aglutininas de elevado peso molecular, que possuem atividade antibacteriana. Estas proteínas estão presentes em taxas relativamente constantes, exibem amplo espectro de atividade e não revelam qualquer característica de memória imunológica (Loesche<sup>72</sup>, 1993; Thylstrup & Fejerskov<sup>118</sup>, 1988). O sistema imune específico apresenta células e órgãos especializados que reconhecem estruturas químicas não-próprias e levam à produção de imunoglobulinas com especificidade para moléculas e/ou células estranhas resultando em neutralização e eliminação da substância

exógena. Este sistema difere do inespecífico por possuir uma memória imunológica (Loesche<sup>72</sup>, 1993).

Os Estreptococos do grupo *mutans* são considerados os principais agentes etiológicos de cáries em humanos e em animais experimentais (Hamada & Slade<sup>38</sup>, 1980; Loesche<sup>72</sup>, 1986). Esta natureza infecciosa do processo de cárie levou à hipótese de que alguma forma de imunidade poderia regular a atividade de cárie nos indivíduos (Bolton & Hlava<sup>7</sup>, 1982). Segundo Loesche<sup>72</sup> (1993), as imunoglobulinas IgA, IgG e IgM estão implicadas na imunidade à cárie.

A imunoglobulina predominante na saliva é IgA (cerca de 80%), que sob condições normais é a única classe ativamente secretada na cavidade bucal (Thylstrup & Fejerskov<sup>118</sup>, 1988; Mesteck<sup>78</sup>, 1978), perfazendo nestas condições 19,4 mg/100 ml de saliva total e podendo chegar a 110 mg/100 ml no fluido gengival durante a inflamação (Loesche<sup>72</sup>, 1993). Variações relacionadas com a idade são ainda relatadas por Tappuni & Challacombe<sup>116</sup> (1994), sendo que concentrações menores são encontradas em crianças pré-dentadas em relação às dentadas, atingindo valores mais elevados nos adultos. A IgA encontrada em secreções difere da IgA sérica em relação à sua estrutura molecular. A IgA-s compõe-se de uma forma dimérica da IgA sérica, que contém uma cadeia polipeptídica extra, chamada de cadeia J ou de ligação, e o componente secretor que é subsequente adquirido durante o transporte seletivo da IgA dimérica através da célula epitelial para o lúmen glandular (Roitt & Lehner<sup>96</sup>, 1980). Sua ação está relacionada possivelmente à neutralização das enzimas dos estreptococos do grupo *mutans* e inibição dos seus fatores de virulência,

pelo bloqueio dos determinantes de aderência, redução da hidrofobicidade e aglutinação bacteriana (Gregory<sup>37</sup>, 1990; Thylstrup & Fejerskov<sup>118</sup>, 1988).

Vários estudos foram feitos com o objetivo de estudar a atividade de IgA secretora, porém não existe nenhuma evidência conclusiva (Winderström<sup>129</sup>, 1992). Experimentos em animais de laboratório têm demonstrado aumento dos níveis de IgA-s anti-*S. mutans* quando os animais são imunizados com amostras cariogênicas (Riviere et al.<sup>93</sup>, 1992; Roitt & Lehner<sup>96</sup>, 1988). Porém, em pesquisas utilizando modelos humanos, os resultados não são tão relevantes (Bolton & Hlava<sup>7</sup>, 1982), sendo na realidade altamente conflitantes. Alguns autores relatam níveis de IgA salivar anti-*S. mutans* maiores em indivíduos cárie-resistentes do que em indivíduos suscetíveis à cárie, sugerindo uma função protetora (Kennedy et al.<sup>50</sup>, 1968; Bolton & Hlava<sup>7</sup>, 1982; Camling & Köhler<sup>17</sup>, 1987; Gregory<sup>37</sup>, 1990). Entretanto, outros autores não obtiveram relação direta do processo de cárie com a atividade de IgA salivar (Orstavik & Brandtzaeg<sup>87</sup>, 1975; Mestecky<sup>78</sup>, 1978; Tenovuo<sup>117</sup>, 1992).

Olsson e Svanberg<sup>86</sup> (1991) relacionaram o nível de atividade de IgA e a capacidade de eliminar cepas de *S. mutans* implantadas experimentalmente. A ação de altos níveis de IgA salivar contra bactérias da placa dentária, dentre eles, *S. mutans* foi também relacionada com proteção contra a gengivite (Schenk et al.<sup>104</sup>, 1993). Camling et al.<sup>16</sup> (1987) analisaram a presença de IgA na saliva e leite materno, porém não encontraram correlação entre estes níveis e a quantidade de *S. mutans* na microbiota bucal indígena.

Apesar da atividade da IgA salivar ainda não estar totalmente esclarecida, vários estudos têm demonstrado a relação entre baixa

experiência de cárie e o nível de IgG sérico anti-*S. mutans* (Butler et al.<sup>15</sup>, 1990; Lehner<sup>69</sup>, 1978; Gregory<sup>37</sup>, 1990). Kent et al.<sup>51</sup> (1992) e Butler et al.<sup>15</sup> (1990) observaram uma correlação entre o nível de IgG anti-*S. mutans* e o baixo número de cáries radiculares em idosos. Segundo Smith et al.<sup>108</sup> (1994), a IgG presente no fluido gengival influi na recolonização de áreas submetidas à profilaxia profissional por *S. mutans* indígena.

A IgG está presente em pequenas quantidades na saliva total (cerca de 1,4 mg/100 ml), porém a sua presença pode aumentar consideravelmente (350 mg/100 ml) no fluido gengival durante a inflamação (Loesche<sup>72</sup>, 1993; Roitt & Lehner<sup>96</sup>, 1988). Os anticorpos IgG agem basicamente através da inibição da aderência microbiana e da glicosiltransferase, além dos seus complexos imunes serem capazes de ativar o sistema complemento e agir como opsonina, facilitando a morte e fagocitose bacteriana (Thylstrup & Fejerskov<sup>118</sup>, 1988).

Estudos com animais têm confirmado a ação protetora de IgG na cárie, tanto pela administração de antígenos proteicos de *S. mutans*, como pela imunização passiva (Lehner<sup>68</sup>, 1981; Filler<sup>30</sup>, 1991). Estudos em primatas demonstraram que após administração sistêmica passiva, os anticorpos IgG anti-*S. mutans* alcançam a superfície dentária através do fluido gengival e é efetiva no declínio da colonização por *S. mutans* e no desenvolvimento das cáries (Lehner et al.<sup>69</sup>, 1978).

Os anticorpos IgM não parecem ser diretamente importantes na imunidade à cárie. Contudo, nos casos de deficiência seletiva de IgA são encontrados IgM anti-*Streptococcus mutans* e estão associados com algum grau de proteção contra a cárie. São encontrados em quantidades bem menores do que a IgA e a IgG, em torno de 0,04 mg/100 ml de saliva total.

Com base na teoria específica de etiologia da cárie e nos vários estudos experimentais de imunização em animais, tem-se tentado a utilização de vacinas anti-cárie em humanos (Loesche<sup>72</sup>, 1993). Filler et al.<sup>30</sup>(1991), propuseram um modelo para verificar a ação passiva de anticorpos presentes no leite bovino, verificando uma diminuição no tamanho das colônias de *S. mutans* isoladas em relação àquelas antes do tratamento e ao grupo controle. Mestecky et al.<sup>78</sup> (1978) concluíram que o consumo de cápsulas contendo *S. mutans* por voluntários humanos resultou em aumento de anticorpos aglutinadores na saliva e em outras secreções. Por outro lado, porém, várias são as preocupações em relação ao uso de vacinas anti-cárie em humanos principalmente devido à reação de anticorpos com o tecido cardíaco humano e a reação inflamatória que pode resultar da imunização parenteral (Thylstrup & Fejerskov<sup>118</sup>, 1988).

Muitos também são os estudos com relação à imunidade implicada às infecções causadas pelas espécies do gênero *Candida* ( Jones<sup>44</sup>, 1989; Budtz-Jørgensen<sup>12</sup>, 1990). A candidose faz parte de um grupo de doenças de interesse particular pois neste caso, ambos os sistemas imunes, secretório e sistêmico, poderão estar envolvidos na manutenção da saúde bucal (Challacombe<sup>18</sup>, 1990). Na realidade, a infecção por este microrganismo, geralmente comensal, só pode ocorrer se as defesas do hospedeiro estiverem comprometidas (Budtz-Jørgensen<sup>18</sup>, 1990).

Roitt & Lehner<sup>96</sup> (1980) citam a relação entre a IgA salivar e a IgG, IgM e IgA séricos anti-*Candida*, como forte sugestão de que o estímulo antigênico iniciado na boca e provavelmente no canal alimentar, induz respostas sistêmicas locais e secretórias.

Deste modo, os fatores de imunidade inespecíficos compreendem além dos citados anteriormente: bactérias comensais; fagocitose por polimorfonucleares neutrófilos e macrófagos; células NK (natural killer); citotoxicidade direta e fixação do complemento (Challacombe<sup>18</sup>, 1990). As bactéria comensais inibem a colonização por *Candida* através da competição por nutrientes essenciais (Knight & Fletcher<sup>56</sup>, 1971), produção de ambiente desfavorável ou bloqueio dos receptores de superfície das células epiteliais (Challacombe<sup>18</sup>, 1990).

Dentre os fatores específicos citam-se os anticorpos séricos e secretórios e a imunidade mediada por células. Nas formas de infecções por *Candida* que estão limitadas à superfície epitelial, a IgA parece exercer papel importante, principalmente causando agregação de fungos e assim prevenindo a sua adesão à mucosa (Heimdahl & Nord<sup>39</sup>, 1990; Epstein et al.<sup>24</sup>, 1982). A identificação da molécula de IgA na superfície de células de *C. albicans* pode ser uma forte evidência do seu papel na proteção contra a candidose bucal, podendo inclusive ser utilizada como forma de diagnóstico (Polonelli et al.<sup>91</sup>, 1991).

A imunidade tanto em candidoses superficiais como profundas está particularmente ligada à imunidade mediada por células (Budtz-Jørgensen<sup>12</sup>, 1990). Estudos em modelos animais utilizando macacos *rhesus* com depressão da imunidade celular anti-*Candida*, mas com reposta humoral normal, mostraram que estes apresentavam infecção por *Candida* severa e prolongada, sugerindo que a imunidade celular é de importância primordial (Budtz-Jørgensen<sup>13</sup>, 1973).

Segundo Budtz-Jørgensen<sup>12</sup> (1990) a resposta imune alterada ou deprimida é fator predisponente nas infecções por *Candida*, como na

AIDS, radioterapias ou no tratamento com drogas imunossupressoras. No entanto, Coogan et al.<sup>19</sup> (1994), num estudo com pacientes HIV positivos e aids, verificaram que existia um aumento nas concentrações de IgA anti-*Candida* nestes grupos, o que estava relacionado com o maior número de microrganismos presentes. Wray et al.<sup>130</sup> (1990) também citam um aumento em IgA e IgG anti-*Candida* na saliva de pacientes HIV positivos.

Existem diversos métodos para quantificar imunoglobulinas anti-*Candida* e a maioria dos autores utilizam o teste ELISA ( Wray et al.<sup>130</sup>,1990; Fetter et al.<sup>29</sup>, 1992; Coogan et al.<sup>19</sup>, 1994), por ser sensível e facilmente automatizado (Jeganathan & Chan<sup>43</sup>, 1992).

### **3 PROPOSIÇÃO**

O objetivo do presente trabalho foi comparar a microbiota cariogênica e fúngica da cavidade bucal de respiradores bucais com indivíduos controle. Também analisamos nos pacientes com SRB os níveis de anticorpos específicos para *C. albicans* e *S. mutans*, comparando-os com aqueles encontrados em indivíduos saudáveis.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 85 pacientes que foram divididos em 3 grupos:

a) Síndrome do respirador bucal (SRB): foram selecionados 30 pacientes de 6 a 11 anos de idade (média  $8,20 \pm 1,73$  anos) que se dirigiram à Disciplina de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, diagnosticados como respiradores bucais antes do início do tratamento (Figuras 1, 2 e 3).

b) Tratado: foram selecionados 25 pacientes, de 8 a 15 anos de idade (média  $11,67 \pm 2,28$  anos), que haviam sido comprovadamente diagnosticados como respiradores bucais e que já haviam concluído o tratamento ortodôntico e/ou fonoaudiológico, deixando de apresentar as características da SRB. O diagnóstico dos 25 pacientes selecionados para o grupo tratado foi realizado entre os anos de 1989 e 1993. A partir deste diagnóstico, 13 pacientes (52%) foram submetidos à tratamento fonoaudiológico e ortodôntico e 12 (48%) exclusivamente à fonoaudiologia, até a regressão do quadro de respiração bucal. O tratamento fonoaudiológico teve duração média de  $14,1 \pm 10,4$  meses e a coleta de saliva realizada após  $13,7 \pm 11,7$  meses pós-tratamento (Dados individuais no Anexo 4, p.103). Foi realizada a reavaliação de todos os pacientes antes da coleta de saliva para a verificação da manutenção dos resultados do tratamento.

c) Controle: foram selecionados 30 pacientes de 6 a 14 anos (média 8,37  $\pm$ 2,11), entre os alunos do EEPSG "Ângelo de Siqueira Afonso", que não apresentavam características da SRB.

Os pacientes foram examinados clinicamente, utilizando-se espátula de madeira e verificando-se o nível de higiene bucal e a presença de lesões de cárie clinicamente evidentes. Foram selecionados pacientes com higiene bucal satisfatória e ausência de lesões de cáries ativas.

Os pais ou responsáveis pelos pacientes assinaram declaração (Anexo 1, p.99) concordando com a participação das crianças no presente trabalho.



FIGURA 1 - Paciente com SRB (Vista frontal). Nota-se boca aberta com queda da mandíbula, alterações na forma do nariz e protrusão incisal.

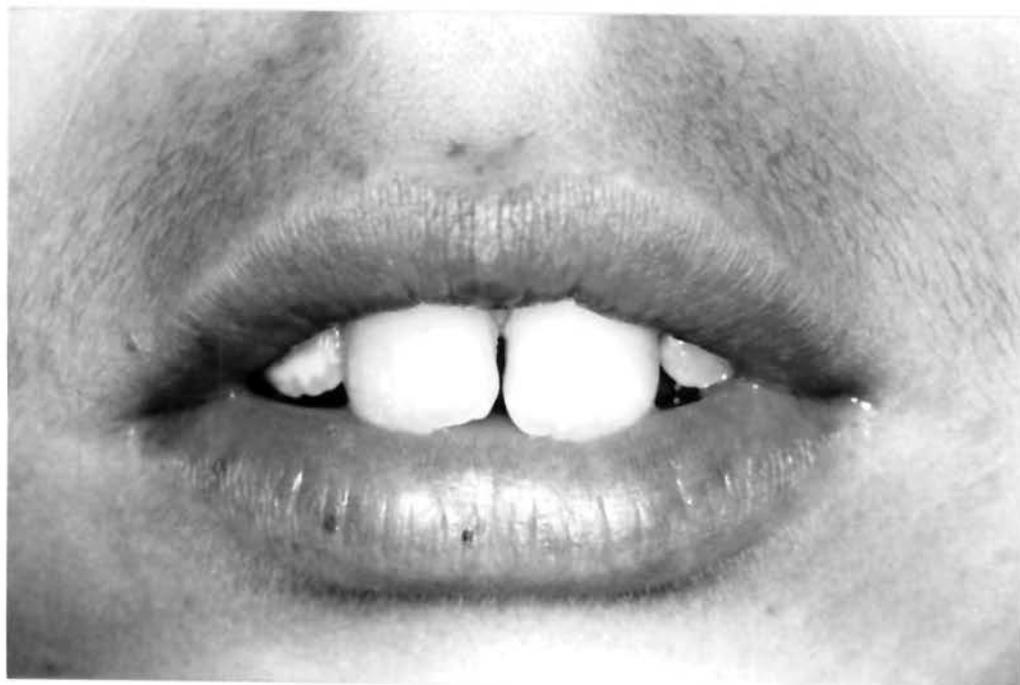


FIGURA 2 - Paciente com SRB (Vista frontal aproximada). Observa-se o ressecamento dos lábios e exposição anormal da região anterior.



FIGURA 3 - Paciente com SRB (Perfil). a) Observa-se a acentuada protrusão dos incisivos superiores e lábios entreabertos. b) Vista aproximada. Observa-se hipotonia dos lábios, com eversão do inferior e superior curto.

O diagnóstico clínico de respiração bucal, foi realizada de acordo com o proposto por Moyers<sup>79</sup> (1979). Os seguintes passos foram considerados:

- a) Análise da respiração: os respiradores nasais mantêm os lábios tocando-se ligeiramente durante a respiração, enquanto nos pacientes com SRB os lábios permanecem separados;
- b) Respiração profunda, a maioria dos respiradores bucais inspiram pela boca. Solicitou-se ao paciente que fechasse os lábios e respirasse profundamente. Os respiradores nasais demonstraram bom reflexo dos músculos alares e as narinas externas dilatadas. Nos respiradores bucais mesmo sendo capazes de respirar pelo nariz, não ocorreu mudança no tamanho ou na forma das narinas.
- c) Para complementação do exame foi realizado o "teste da água", no qual determinada quantidade de água era colocada na boca do paciente e aguardava-se por 3 minutos. Se o paciente não conseguisse manter a água por este período de tempo na boca, por dificuldade de respiração, era confirmado como respirador bucal.

#### **4.1 Determinação do fluxo salivar**

A determinação do fluxo salivar, baseada em Krasse<sup>65</sup> (1986), foi realizada utilizando-se um pedaço de goma de mascar sem sabor e um cálice graduado de 30 ml. Inicialmente a goma foi colocada na boca do paciente e deixada por 2 minutos, sendo a saliva acumulada neste período deglutida. Solicitou-se, então, ao paciente que mastigasse a goma e toda a saliva produzida foi coletada no cálice por um período de 5 minutos,

calculando-se o valor do fluxo salivar por minuto (ml/min.). A interpretação e os escores atribuídos encontram-se na Tabela 1. A partir da amostra de saliva coletada foram executados os demais exames constantes da Figura 5.

Tabela 1 - Interpretação da determinação do fluxo salivar e escores atribuídos, de acordo com a quantidade de saliva (ml) obtida por minuto.

Quantidade de saliva (ml/min.)	Interpretação	Escores atribuídos
acima 1,0	normal	0
abaixo de 0,7	diminuída	2
abaixo de 0,1	xerostomia	3

#### 4.2 Determinação da capacidade tampão da saliva

A capacidade tampão da saliva foi determinada, segundo o método de Ericson<sup>25</sup> (1959), colocando-se, com auxílio de pipeta, 1 ml da amostra de saliva coletada de cada paciente, em um tubo de ensaio contendo 3 ml de ácido clorídrico (HCl) 0,005 N. O tubo de ensaio foi levemente agitado e deixado em repouso por 10 minutos. Após este período foi realizada a mensuração em pHmetro (Procyon PHD-10). Os resultados obtidos foram classificados de acordo com os parâmetros expressos na Tabela 2.

Tabela 2 - Interpretação da capacidade tampão da saliva e escores atribuídos.

pH	Interpretação	Escore
5 a 7	normal	0
4 a 5	valores limites	1
abaixo de 4	baixa	3

### 4.3 Teste de Snyder

Amostra de 0,2 ml de saliva de cada paciente foi semeada em tubo contendo 8 ml de meio de Snyder (Difco) mantido a 45°C em banho-maria. O tubo foi agitado delicadamente, para não formar bolhas de ar, e incubado a 37°C por 72 horas. O teste foi considerado positivo quando a cor do meio passou de verde para amarelo em leituras realizadas após 24, 48 e 72 horas de incubação. A interpretação foi realizada de acordo com a Tabela 3, considerando-se escores de zero a 3.

Tabela 3 - Interpretação do teste de Snyder e atribuição de escores.

Atividade de cárie	escores	Resultado após incubação durante		
		24 horas	48 horas	72 horas
negativa	0	negativo	negativo	negativo
pequena	1	negativo	negativo	positivo
moderada	2	negativo	positivo	-
acentuada	3	positivo	-	-

#### 4.4 Contagem de estreptococos do grupo *mutans* na saliva

Um mililitro da amostra de saliva (item 4.1, p.34) foi diluída em 9 mililitros de solução de NaCl a 0,9% esterilizada, obtendo-se as diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . A partir da saliva pura e de cada diluição, foi semeado 0,1 ml, em duplicata, em placas contendo meio Mitis-Salivarius (Difco) acrescido de 20% de sacarose (Difco) e 0,2 unidades de bacitracina (Sigma) por mililitro de meio. Após incubação por 72 horas a 37° C em microaerofilia (método da vela), as colônias características de estreptococos do grupo *mutans* foram contadas nas placas que continham de 30 a 300 colônias (contador de colônias Phoenix, modelo EC550A).

A interpretação foi feita considerando-se alto risco de cárie (escore 3) pacientes que apresentaram contagens acima de 100.000 unidades formadoras de colônias (UFC) de estreptococos/ml de saliva, para os abaixo deste número considerou-se escore 0 (Anderson et al.<sup>3</sup>, 1993).

#### 4.5 Contagem de lactobacilos na saliva

A partir da amostra de saliva pura (item 4.1, p.34) e das diluições obtidas (item 4.4, p.37), alíquotas de 0,1 ml de cada diluição e da saliva pura foram colocadas no fundo de placas de Petri esterilizadas. A seguir, 20 ml de meio de Rogosa (Difco) previamente preparado e mantido a 45° C em banho-maria, foi vertido em cada placa, agitado delicadamente, e após solidificação incubados a 37° C por 72 horas. Após estes período, o número de UFC/ml foi calculado em contador de colônias, nas placas que continham de 30 a 300 colônias.

A interpretação foi feita de acordo com a tabela abaixo, baseada em Newbrun<sup>80</sup> (1992), atribuindo-se escores de 0 a 3.

Tabela 4 - Correlação do número de Lactobacilos com a suposta atividade de cárie e os respectivos escores atribuídos.

Número de Lactobacilos	ATIVIDADE DE CÁRIE	ESCORES
0 - 1.000	NEGATIVA	0
1.000 - 5.000	PEQUENA	1
5.000 -10.000	MODERADA	2
Maior que 10.000	ACENTUADA	3

#### 4.6 Contagem de leveduras na saliva

Placas contendo ágar Sabouraud Dextrose adicionado de 0,1 mg/ml de meio de Cloranfenicol (Quemacetina Succinato/Carlo Erba) foram semeadas em duplicata, com alíquotas de 0,1 ml de saliva pura e das diluições obtidas (item 4.4, p.37). Após incubação a 37° C por 48 horas, as colônias características de leveduras foram calculadas nas placas que continham de 30 a 300 colônias. A correlação com a atividade de cárie, baseada em Pienihäkkinen<sup>88</sup> (1987), e os respectivos escores encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Correlação de número de UFC/ml de leveduras na saliva com a atividade de cáries e escores atribuídos

Número de UFC/ml saliva	ATIVIDADE DE CÁRIE	ESCORES ATRIBUÍDOS
0	Negativa	0
abaixo de 100	Pequena	1
100 - 400	Moderada	2
acima de 400	Acentuada	3

#### 4.7 Isolamento e identificação de leveduras da saliva

Das colônias de microrganismos que cresceram nas placas de ágar Sabouraud cloranfenicol (item 4.6, p. 38), foram feitos esfregaços corados pelo método de Gram. Quando na microscopia, foram observadas células ovaladas, grandes, Gram-positivas, com ou sem brotamento, sugestivas de *Candida*, as colônias eram transferidas para tubos contendo ágar Sabouraud dextrose para posterior identificação. Para caracterização das amostras foram realizadas as seguintes provas, de acordo com Sandven<sup>103</sup> (1990):

##### 4.7.1 Formação do tubo germinativo

Para observação da formação do tubo germinativo adicionou-se uma alçada de cultura pura, de 24 horas, em tubo de ensaio (13x170 mm) contendo 0,5 ml de soro estéril de coelho, o qual foi colocado em banho-

maria a 37<sup>o</sup> C, por 2 a 3 horas. A formação de tubo germinativo foi observada em microscopia de luz, colocando-se uma gota de suspensão entre lâmina e lamínula.

#### 4.7.2 Produção de hifas/pseudohifas e clamidósporos

Para a verificação da produção de hifas e clamidósporos foi utilizado o meio ágar-fubá tween 80 (pH 5.6) com a seguinte constituição:

Fubá.....	40 g
Ágar (Difco).....	20 g
Tween 80.....	10 ml
Água destilada.....	1000 ml

O fubá foi dissolvido em 800 ml de água destilada, aquecido em banho-maria durante 1 hora, filtrado (Filtro Whatman, número 40) e deixado em repouso para decantação. O ágar (Difco) foi fundido separadamente em 200 ml de água destilada e adicionado o tween 80 e o filtrado de fubá. Após a distribuição em Erlenmeyer de 50 ml, o meio foi autoclavado a 120°C/15 minutos e armazenado em geladeira.

Para a execução da prova, o ágar-fubá previamente fundido, foi distribuído em lâminas de vidro depositadas sobre bastão de vidro em "U", colocados no interior de placas de Petri esterilizadas. Após a solidificação do ágar, cada amostra de levedura a ser testada foi semeada em estria única na superfície do meio e colocada uma lamínula no centro da lâmina. Para evitar dessecação do meio, foi adicionado um pedaço de papel de filtro esterilizado e umedecido no fundo da placa. Após incubação por 48 a 72 horas à temperatura ambiente, a leitura foi feita em microscopia de luz,

observando-se presença de clamidósporos e filamentação com produção de hifas/pseudohifas.

#### 4.7.3 Fermentação de carboidratos

Na fermentação de carboidratos foi usado caldo de vermelho de fenol (Difco) distribuídos em tubos de ensaio, com tubos de Durhan em seu interior e autoclavados a 120°C/15 minutos. Cada açúcar (glicose, maltose, sacarose e lactose), esterilizado por filtração (filtro Millipore, GSWP-02500), foi adicionado de forma a obter concentração de 1%. Os tubos foram semeados a partir de cultura pura de 24 horas da levedura em ágar Sabouraud dextrose, e a leitura realizada feita após 48 horas e uma semana.

#### 4.7.4 Assimilação de carboidratos

Para a assimilação de carboidratos foi utilizado o seguinte meio:

Sulfato de amônia.....	5,0 g
Fosfato de potássio monobásico.....	1,0 g
Sulfato de magnésio.....	0,5 g
Ágar.....	20,0 g
Água destilada.....	1000,0 ml

Após dissolução em banho-maria, o meio foi distribuído (18-20 ml) em tubo de ensaio, autoclavado a 120°C por 15 minutos e armazenado em geladeira. Para a execução da prova, foi preparada uma suspensão da levedura (tubo nº 10 da escala McFarlane) em solução fisiológica esterilizada a partir de cultura de 24 horas em ágar Sabouraud

dextrose. Desta suspensão foi colocado 0,1 ml em placa de Petri esterilizada.

O meio previamente liquefeito e resfriado (45°C aproximadamente) foi vertido na placa sobre suspensão de levedura e agitado delicadamente. Após solidificação, discos de papel de filtro esterilizados e embebidos em solução dos carboidratos a 10% foram colocadas a intervalos regulares de espaço.

Após incubação de 72 horas a 37°C, a leitura foi feita pela observação da formação de um halo de crescimento da amostra de levedura ao redor do açúcar assimilado na prova positiva ou de sua ausência na prova negativa.

#### 4.7.5 Interpretação dos resultados

As amostras de *Candida* isoladas foram classificadas em espécies, de acordo com a Tabela 6.

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS, DE MICROCULTIVO E FORMAÇÃO DE TUBO GERMINATIVO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida*.

ESPÉCIES DE <i>Candida</i>	FERMENTAÇÃO				ASSIMILAÇÃO					TUBO GERM.	CLAMID.	PSEUDO ou HIFA VERD.
	GLIC.	SAC.	MALT.	LACT.	GLIC.	GAL	SAC.	MALT.	LACT.			
<i>C. albicans</i>	AG	A/-	AG	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>C. guilliermondii</i>	AG	A/AG	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>C. krusei</i>	AG	-/-	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. lipolytica</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. lusitaniae</i>	AG	AG	-/-	-/-	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>C. parapsilosis</i>	AG	-/-	-/-	-/-	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>C. kefyr</i> ( <i>C. pseudotropicalis</i> )	AG	AG	-/-	AG	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>C. rugosa</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>C. stellatoidea</i> *	AG		AG	-/-	+	+	-	+	-	V	V	+
<i>C. tropicalis</i>	AG	AG	AG	-/-	+	+	+	+	-	-	V	+
<i>C. glabrata</i>	AG	-/-	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. famata</i>	AG(V)	-/-	-/-	AG(V)	+	+	+	+	+	-	-	-

\* Considerada como uma variante de *C. albicans*

Baseado em SAMARANAYAKE e MacFARLANE, 1990 e SANDVEN, 1990

A = produção de ácido

G = produção de gás

V = variável (+ ou -)

#### 4.8 Pesquisa de anticorpos anti-*Candida* e anti-*Streptococcus mutans* na saliva

##### 4.8.1 Preparo do antígeno

Os antígenos foram preparados de acordo com o proposto por Gomez et al.<sup>36</sup> (1992), a partir de amostra de *C. albicans* (F-72), cultivada em caldo Sabouraud dextrose, e a partir de amostra de *S. mutans* (Y-4), cultivada em caldo infuso de cérebro-coração (BHI-Difco), ambas provenientes do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos/UNESP. As amostras foram incubadas a 37°C durante 72 horas sob agitação. A cultura foi centrifugada a 2.000 r.p.m./20 min., o sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em tampão PBS e centrifugado novamente. As células foram lavadas por mais 2 vezes seguindo-se o mesmo procedimento. A seguir o sedimento foi suspenso em tampão Tris 125 mM, pH 6.9, uréia 6M, mercaptoetanol 20mM e Tween 20 a 1%, fervido durante 5 minutos e incubado por 24 horas a 4°C. O material solúvel foi separado por centrifugação (15.000 r.p.m./20 min.), dializado contra água bidestilada por 24 horas e a seguir liofilizado (liofilizador MLW LGA 05).

##### 4.8.2 Técnica ELISA

A concentração ótima de antígeno para a sensibilização das placas foi previamente estabelecida por titulação em bloco. Para isto se utilizou soros positivos e negativos, variando as concentrações dos antígenos de 1 a 20 µg/ml. Padronizadas as condições, as placas de polistireno, com 96 orifícios (Hemobag), foram sensibilizadas com 50µl de

antígeno (5  $\mu\text{g/ml}$ ) de *Candida* e (5  $\mu\text{g/ml}$ ) de *S. mutans* em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6, incubadas por 2 horas em estufa a 37°C e guardadas a 4°C até o uso. Antes do uso as placas foram lavadas uma vez com PBS e os sítios livres do polistireno bloqueados com 0,5% de gelatina em PBS, por 45 minutos, a 37°C.

Após a incubação as placas foram lavadas, 4 vezes, com PBS contendo 0,1% de Tween 20. A saliva foi diluída 1/10 em PBS-Tween-gelatina (PBS-TG) e adicionada aos orifícios, em duplicatas e as placas incubadas a 37°C por 2 horas e 4°C por uma noite. No dia seguinte, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-T-G e 50 $\mu\text{l}$  do conjugado anti-IgG, IgA e IgM humanas, marcado com peroxidase, foram adicionados aos orifícios, numa concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ .

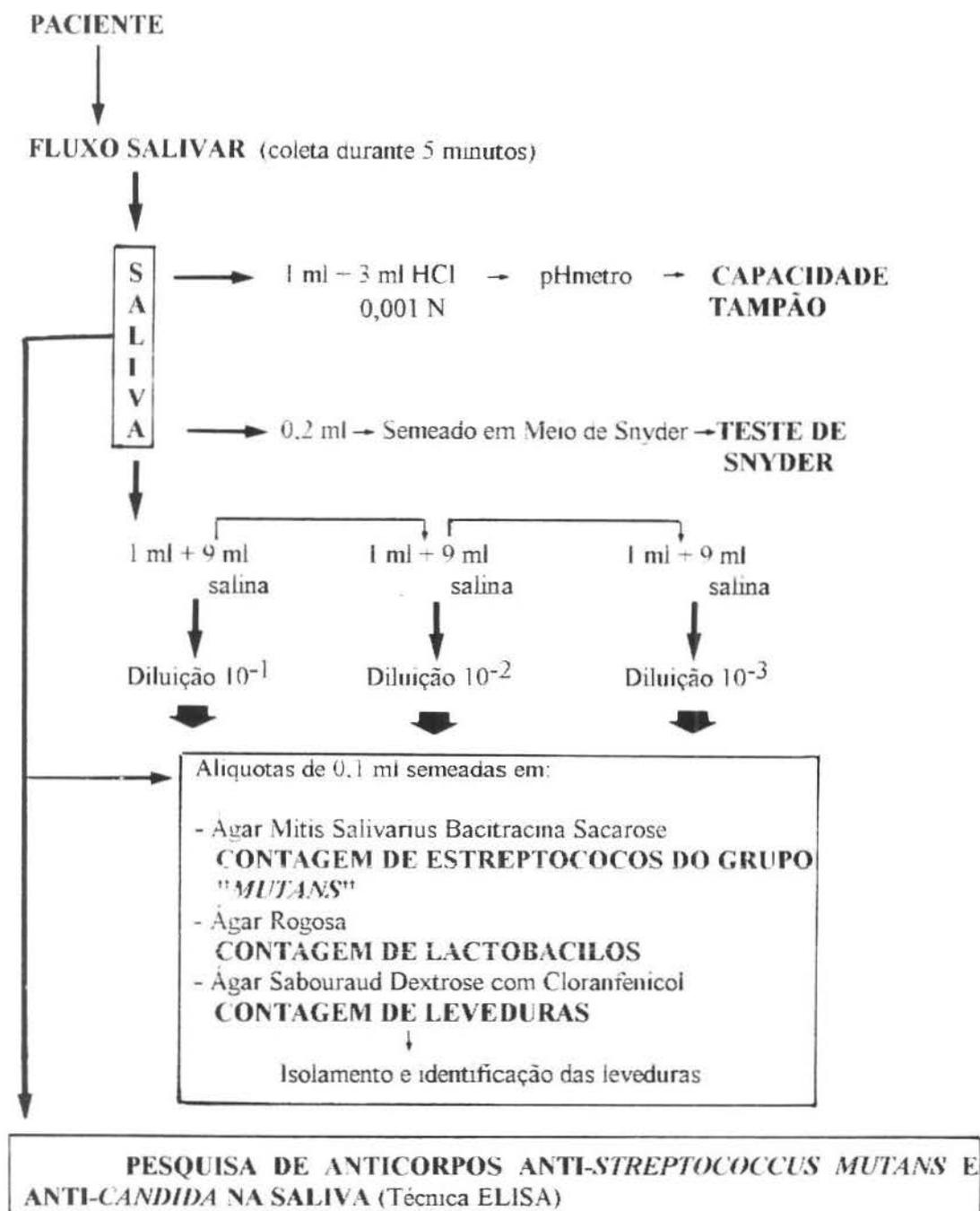
A atividade de peroxidase foi revelada utilizando-se o substrato ortofenilenodiamino (Sigma) 6mg e 12 ml de tampão citrato-ácido cítrico 0,1 M, pH 5,5 e adicionando-se 100 $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%. A reação com o substrato (100 $\mu\text{l}$ ) foi desenvolvida por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente e imediatamente bloqueada com 50 $\mu\text{l}$  de ácido sulfúrico 2N. As densidades óticas (DO) foram lidas a 492 nm num leitor de ELISA (Multiskan MCC/340 MKII), sendo os valores considerados a partir da média de duas leituras, como o valor da DO.

Os percentuais de aumento dos níveis de imunoglobulinas foram calculados a partir da média obtida para os controles.

#### **4.9 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada através do teste *t* de Student, para comparação entre duas médias, sendo fixado o nível de significância em 5% (Vieira<sup>125</sup>, 1983).

FIGURA 5 - Esquema dos procedimentos realizados com a saliva coletada de cada paciente.



## 5 RESULTADOS

As interpretações dos testes microbiológicos de atividade de cárie, encontram-se na Tabela 7. Podemos observar maior número (56,7%) de pacientes do grupo controle com resultados negativos para o teste de Snyder em relação aos respiradores bucais (30%), enquanto o grupo tratado apresentou valor intermediário entre os dois grupos (48%). A atividade de cárie acentuada predominou no grupo respirador bucal.

Nas contagens de lactobacilos, as interpretações apresentaram-se semelhantes nos grupos controle e respirador bucal (10 e 13,3% respectivamente) enquanto para o grupo tratado 32% dos pacientes apresentaram números elevados de lactobacilos na saliva. As contagens de estreptococos do grupo *mutans* demonstraram maior número de respiradores bucais (21, equivalente a 70% da amostra) com atividade de cárie acentuada, seguindo-se o grupo tratado e controle (48% e 43,3% respectivamente). O grupo respirador bucal também apresentou maior número de leveduras em relação aos outros grupos, sendo que 30% da amostra foi classificada como de atividade de cárie acentuada. O grupo tratado apresentou valores semelhantes ao grupo respirador bucal (28% da amostra com atividade de cárie acentuada) e superiores aos dos controles.

Tabela 7 - Número e porcentagem de pacientes nas respectivas interpretações do teste de Snyder, contagens de lactobacilos, estreptococos do grupo *mutans* e de leveduras nos grupos controle (n=30), respirador bucal (n=30) e tratado (n=25).

TESTE	CONTROLE		RESPIRADOR BUCAL		TRATADO	
	n	%	n	%	n	%
SNYDER						
acentuada	1	3,33	5	16,67	2	8,00
moderada	10	33,33	8	26,67	7	28,00
pequena	2	6,67	8	26,67	4	16,00
negativa	17	56,67	9	30,00	12	48,00
LACTOBACILOS						
acentuada	3	10,00	4	13,33	8	32,00
moderada	2	6,67	2	6,67	2	8,00
pequena	7	23,22	7	23,33	3	12,00
negativa	18	60,00	17	56,67	12	48,00
GRUPO MUTANS						
acentuada	13	43,33	21	70,00	12	48,00
negativa	17	56,67	9	30,00	13	52,00
LEVEDURAS						
acentuada	7	23,33	9	30,00	7	28,00
moderada	1	3,33	2	6,67	0	0
pequena	5	16,67	5	16,67	1	4,00
negativa	17	56,67	14	46,66	17	68,00

As médias do logaritmo do número de UFC/ml de lactobacilos e estreptococos do grupo *mutans* (Tabela 8) apresentaram-se em maior número no grupo tratado, seguidas pelas médias do grupo SRB e controle. As médias para o número de leveduras, porém, foram mais altas para o grupo respirador bucal. As médias das UFC/ml no grupo controle apresentaram-se sempre em número menor em relação aos grupos SRB e tratado, porém estas diferenças apresentaram-se estatisticamente significativas apenas para a contagem de estreptococos do grupo *mutans*, conforme pode ser verificado na Tabela 8.

Tabela 8 - Médias e desvio-padrão do logaritmo do número de UFC/ml de saliva obtidas nas contagens de lactobacilos, estreptococos do grupo *mutans* e leveduras nos grupos controle (n=30), respirador bucal (n=30) e tratado (n=25).

MICROORGANISMO	CONTROLE	RESPIRADOR BUCAL	TRATADO
LACTOBACILOS	1,95 ± 1,75	2,30 ± 1,65	2,61 ± 1,98
GRUPO <i>MUTANS</i>	4,85 ± 0,83	4,93 ± 0,70	5,43 ± 0,78*
LEVEDURAS	1,11 ± 1,45	1,44 ± 1,61	1,10 ± 1,74

\* Diferença estatisticamente significativa a nível de 0,5% em relação aos controles

A avaliação do fluxo salivar (Tabela 9) apresentou valores semelhantes para o grupo controle e respirador bucal. No grupo tratado, uma porcentagem bem menor de pacientes com diminuição do fluxo salivar foi observado em relação aos demais grupos (4%). Para a capacidade

tampão da saliva, observa-se que 100% dos pacientes do grupo controle apresentaram valores normais. Valores limites foram encontrados em 6,67% dos pacientes do grupo respirador bucal e 4% do tratado.

Tabela 9 - Número de pacientes e as respectivas interpretações dos testes salivares de atividade de cárie nos grupos controle (n=30), respirador bucal (n=30) e tratado (n=25).

TESTE	CONTROLE		RESPIRADOR BUCAL		TRATADO	
	n	%	n	%	n	%
<b>FLUXO SALIVAR</b>						
- Normal	26	86,67	24	83,33	24	96,00
- Diminuído	4	13,33	6	16,67	1	4,00
- Xerostomia	0	0	0	0	0	0
<b>CAPACIDADE TAMPÃO</b>						
- Normal	30	100,00	28	93,33	23	92,00
- Valores limites	0	0	2	6,67	1	4,00
- Baixa	0	0	0	0	1	4,00

Na Tabela 10, podemos observar os escores atribuídos para o teste de Snyder, o fluxo salivar (ml) e a capacidade tampão da saliva (pH). No teste de Snyder, a média dos escores foi superior nos respiradores bucais em relação aos outros grupos. O grupo tratado apresentou valor ligeiramente superior ao do grupo controle, porém esta diferença não se apresentou estatisticamente significativa. As médias das medidas da capacidade tampão apresentaram resultados melhores e com significância estatística para o grupo controle tanto em relação ao respirador bucal como

para o tratado, entretanto quando da comparação entre os grupos respirador bucal e tratado os resultados foram semelhantes. O fluxo salivar apresentou valores maiores e conseqüentemente mais favoráveis para os SRB em relação aos outros grupos.

Tabela 10 - Médias e desvio-padrão dos escores atribuídos para o teste de Snyder, do fluxo salivar (ml) e os pH obtidos nos testes da capacidade tampão da saliva, nos grupos controle (n=30), respirador bucal (n=30) e tratado (n=25).

TESTE	CONTROLE	RESPIRADOR BUCAL	TRATADO
SNYDER (Escore)	0,83 ± 1,02	1,30 ± 1,09	0,96 ± 1,06
FLUXO SALIVAR (ml)	1,85 ± 1,66	2,23 ± 1,37	1,61 ± 0,68**
CAPACIDADE TAMPÃO (pH)	6,57 ± 0,78	6,04 ± 0,62*	6,04 ± 1,11*

\* Diferença estatisticamente significativa a nível de 0,5% em relação aos controles.

\*\* Diferença estatisticamente significativa a nível de 0,5% em relação aos respiradores bucais.

O valor da soma e a média dos escores atribuídos a todos os testes estão expressos na Tabela 11. Podemos observar nesta Tabela, que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos respirador bucal e tratado em relação aos controles. Comparando-se a soma dos escores podemos verificar que foram semelhantes entre os grupos tratado e controle, com total de 116 e 117 respectivamente.

Tabela 11 - Número da soma de escores obtido para cada grupo, médias e desvio-padrão da soma dos escores atribuídos para o teste de Snyder, fluxo salivar, capacidade tampão e contagem de lactobacilos, estreptococos do grupo *mutans* e leveduras de cada paciente dos grupos controle (n=30), respirador bucal (n=30) e tratado (n=25).

GRUPOS	TOTAL DE ESCORES	MÉDIA + DESVIO PADRÃO
CONTROLE	117	3,90 ± 2,70
RESPIRADOR BUCAL	172	6,63 ± 2,95*
TRATADO	116	4,64 ± 3,62**

\* Diferença estatisticamente significativa a nível de 0,5% em relação aos controles.

\*\* Diferença estatisticamente significativa a nível de 0,5% em relação ao grupo respirador bucal.

O número de pacientes com leveduras foi maior nos pacientes respiradores bucais. Na Tabela 12, verifica-se que 60% dos SRB e apenas 33,3% do grupo controle e 36% no tratado apresentaram leveduras na saliva. Em relação às espécies encontradas (Tabela 13), em todos os grupos ocorreu predominância da espécie *Candida albicans* (80% para o grupo controle, 83,33% para os respiradores bucais e 85,71% para o grupo tratado). No grupo controle, além da *C. albicans* foram encontrados também *C. lusitaniae* e *C. kefir*; no grupo respirador bucal foram encontradas 2 amostras de *C. lusitaniae* e 1 de *C. kefir*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*; e, no grupo tratado encontrou-se duas amostras de *Candida sp.* Considerando-se os 3 grupos foram isoladas 39 amostras sendo 30 (76,92%) de *C. albicans*, 3 (7,69%) de *C. lusitaniae*, 2 (5,14%) de *C. kefir*, 1 (2,56%) de *C. guilliermondii*, 1 (2,56%) de *C. tropicalis* e 2 (5,13%) de *Candida sp.* Dois pacientes respiradores bucais (*C. albicans* e *C. lusitaniae*, *C. albicans* e *C. guilliermondii*) e dois do grupo tratado (*C.*

*albicans* e *C. tropicalis*, em ambos os casos), apresentaram mais de uma espécie de *Candida* na saliva.

Tabela 12 - Número e percentual de pacientes que apresentaram leveduras na cavidade bucal nos grupos estudados. Dos pacientes positivos, foi calculada a média e desvio-padrão do logaritmo do número de UFC de leveduras por ml de saliva. Grupos controle (n=30), respirador bucal (n=30) e tratado (n=25).

GRUPOS	NÚMERO POSITIVOS	%	MÉDIA E DESVIO-PADRÃO DAS UFC/ml
CONTROLE	10	33,33	2,60 ± 0,94
RESPIRADOR BUCAL	18	60,00	2,80 ± 1,07*
TRATADO	9	36,00	1,10 ± 1,74*,**

\* Diferença estatisticamente significativa a nível de 0,5% em relação aos controles.

\*\* Diferença estatisticamente significativa a nível de 0,5% em relação aos respiradores bucais

Tabela 13 - Espécies de leveduras isoladas e identificadas das amostras de saliva nos grupos controle (n=30), respirador bucal (n=25) e tratado (n=25).

ESPÉCIES DE <i>Candida</i>	CONTROLE		RESPIRADOR BUCAL		TRATADO	
	n	%	n	%	n	%
<i>ALBICANS</i>	8	80,00	15	83,33	7	85,71
<i>LUSITANIAE</i>	1	10,00	2	11,11	0	0
<i>KEFYR</i>	1	10,00	1	5,55	0	0
<i>GUILLIERMONDII</i>	0	0	1	5,55	0	0
<i>TROPICALIS</i>	0	0	1	5,55	0	0
<i>CANDIDA SP</i>	0	0	0	0	2	28,57

Na Tabela 14, podemos observar que os pacientes do grupo controle apresentaram valores de IgA anti-*Streptococcus mutans* superiores, seguido pelo grupo tratado e respiradores bucais que apresentaram valores semelhantes.

Os valores de DO para os anticorpos anti-*Candida* estão representados na Tabela 15. O grupo controle apresentou média superior em relação aos demais grupos, porém sem diferença estatisticamente significativa. A Tabela 16 demonstra a porcentagem de aumento de DO dos anticorpos anti-*Streptococcus mutans* nos grupos respirador bucal e tratado em relação ao controle. Verifica-se que apenas ocorreu aumento na IgG nos dois grupos em relação ao grupo controle. Na Tabela 17, observamos a porcentagem de aumento para anticorpos anti-*Candida*, onde houve aumento para IgG apenas no grupo tratado em relação aos controles.

Tabela 14 - Média, desvio-padrão e mediana dos valores de DO obtidos para IgA, IgM e IgG anti- *Streptococcus mutans* nos grupos controle (n=30), respirador bucal (n=30) e tratado (n=25).

GRUPOS	IgA		IgM		IgG	
	média+DP	mediana	média+DP	mediana	média+DP	mediana
CONTROLES	35,7+63,7	21	50,5+85,4	22	15,6+18	10
RESPIRADOR BUCAL	24,6+30,8	12	31,2+43,4	18	18,2+43	1
TRATADOS	21,8+28,4	4,5	10,7+13,2* <sup>**</sup>	5	24,2+24,4	21,5

\* Diferença estatisticamente significativa a nível de 0,5% em relação aos controles.

\*\* Diferença estatisticamente significativa a nível de 0,5% em relação aos respiradores bucais.

Tabela 15 - Média, desvio-padrão e mediana dos valores de DO obtidos para IgA, IgM e IgG anti-*Candida* nos grupos controle (n=30), respirador bucal (n=30) e tratado (n=25).

GRUPOS	IgA		IgM		IgG	
	média+DP	mediana	média+DP	mediana	média+DP	mediana
CONTROLE	130+269	49	95,7+261	27	48,5+79,6	20
RESPIRADOR BUCAL	91,5+167	16	60,7+168	11	49,1+78,1	25
TRATADO	61,7+108	25	36,0+57,4	20,5	71,0+193	14

- Não houve diferença estatisticamente significativa entre nenhuma das médias

Tabela 16 - Média e desvio-padrão para porcentagem de aumento de DO obtidos para IgA, IgM e IgG anti-*Streptococcus mutans* em relação à média dos valores do grupo controle.

GRUPOS	IgA	IgM	IgG
RESPIRADORES BUCAIS	69,0+86,3	61,8+86,0	117+275
TRATADO	61,0+79,5	21,2+45,8	155+156

Tabela 17 - Média e desvio-padrão para porcentagem de aumento das DO para IgA, IgG e IgM anti-*Candida* em relação à média dos valores do grupo controle.

GRUPOS	IgA	IgM	IgG
RESPIRADORES BUCAIS	70,4+128	57,1+177	97,3+161
TRATADO	47,5+83	37,6+60,0	146+399

Para facilitar a interpretação dos valores de DO obtidos para cada paciente nos diferentes grupos para IgG, IgA e IgM anti-*Candida*, foram confeccionadas as figuras de 4 e 5, nas quais os valores da DO de cada paciente está representado como 1 ponto, a média dos controle como um traço contínuo e a média somada a 2 desvios-padrão como traço pontilhado. Na Figura 4, pode-se observar que a maioria dos pacientes respiradores bucais apresentaram valores de IgG anti-*Candida* inferiores à média dos controles. Oito pacientes apresentaram-se acima da média, entretanto apenas 2 revela diferença representativa. Para IgA, observa-se que apenas 5 pacientes apresentaram-se acima desta média, dentre os quais apenas 1 revelou diferença representativa. A maior parte dos pacientes também se mantiveram abaixo da média dos controles para valores de IgM, sendo que 2 apresentaram-se acima desta e apenas 1 valor pode ser considerado representativo.

Na Figura 5 observa-se os valores de IgG para o grupo tratado, sendo que 5 pacientes apresentaram valores acima da média, porém apenas 2 podem ser considerados representativos. Para IgA, a grande maioria apresentou-se abaixo da média dos controles, com apenas 2 valores acima desta, mas nenhum revelando diferença representativa. Os valores de IgM também se apresentaram abaixo da média dos controles em sua maioria com apenas 1 valor acima desta.

Para imunoglobulinas anti-*Streptococcus mutans* (Figuras 6 e 7), observa-se para IgG (Figura 6), a concentração maior dos valores abaixo da média dos controles, apresentando 8 valores acima desta média e com 4 valores revelando diferença representativa. Para IgA, 7 pacientes apresentaram-se acima da média dos controles porém não podem ser

considerados representativos. Os valores para IgM estavam acima da média dos controles em 7 pacientes.

O grupo tratado (Figura 7) apresentou valores de IgG anti-*S. mutans* acima da média em 16 pacientes, com 2 valores representativos. Para IgA 7 valores e para IgM 1 valor encontrou-se acima desta média, porém nenhum destes valores revelou diferença representativa.

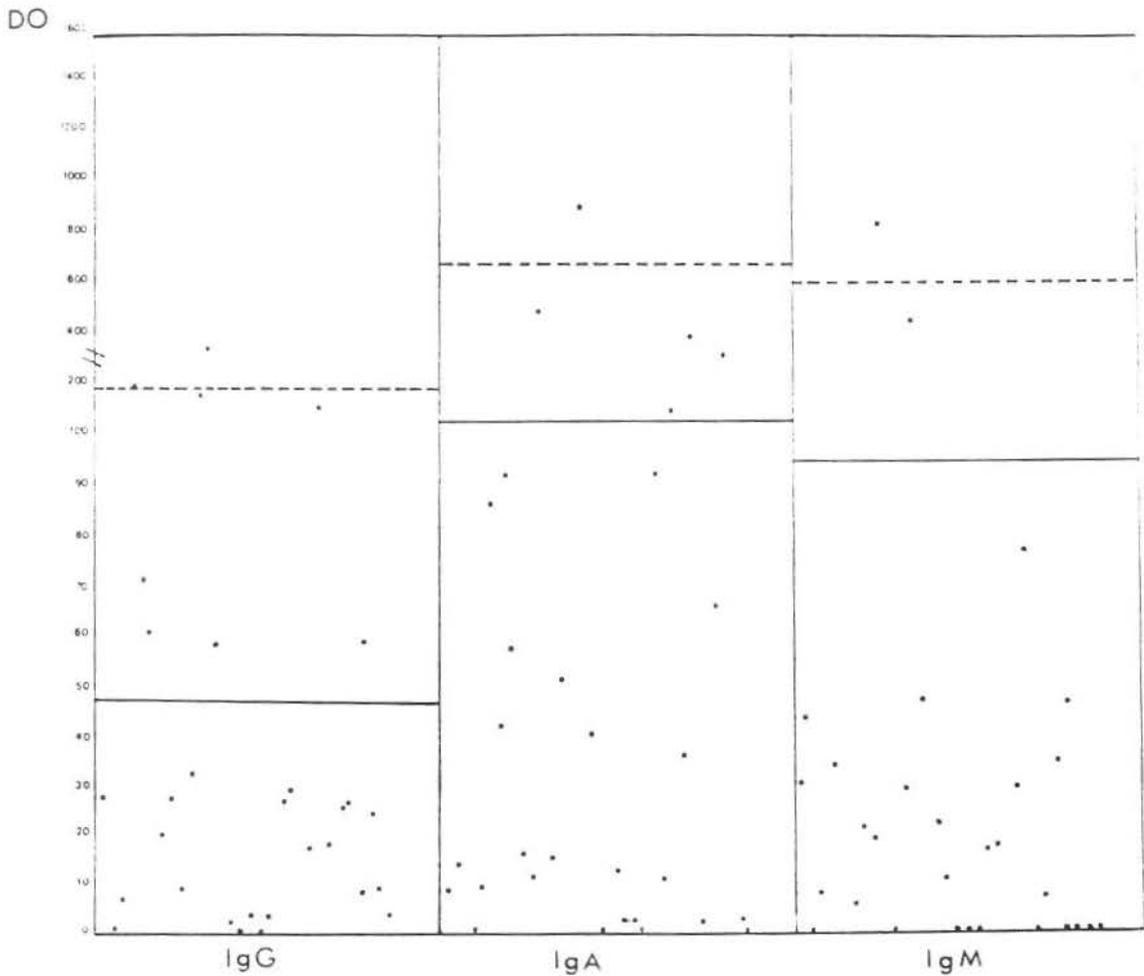


FIGURA 4 - Níveis salivares de imunoglobulinas anti-*Candida* das classes IgG, IgA e IgM nos pacientes com SRB (n=30). Resultados expressos em DO a 492 nm. Cada ponto representa um paciente, a linha contínua a média dos controles e a linha pontilhada a média dos controles somada a dois desvios-padrão.

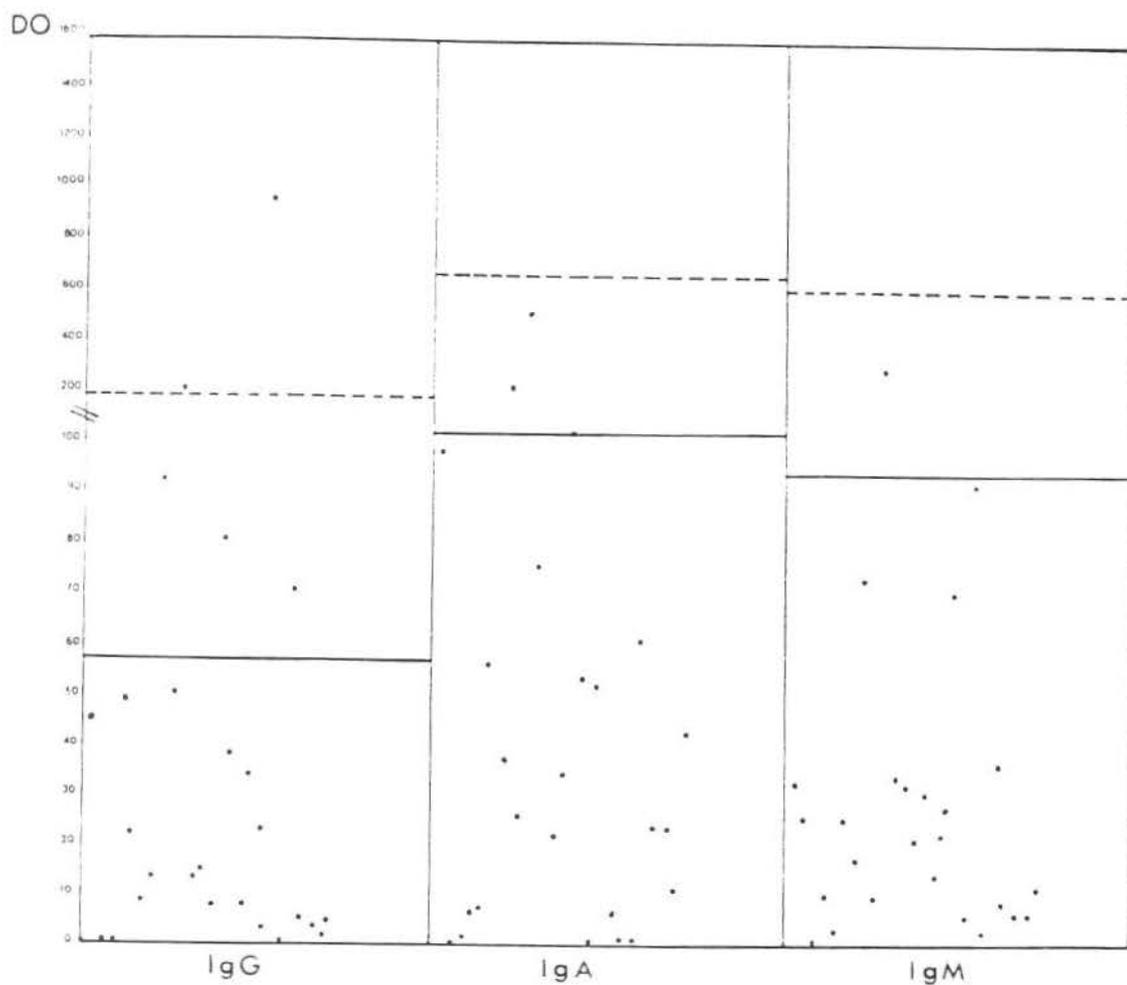


FIGURA 5 - Níveis salivares de imunoglobulinas anti-*Candida* das classes IgG, IgA e IgM nos pacientes do grupo tratado (n=25). Resultados expressos em DO a 492 nm. Cada ponto representa um paciente, a linha continua a média dos controles e a linha pontilhada a média dos controles somada a dois desvios-padrão.

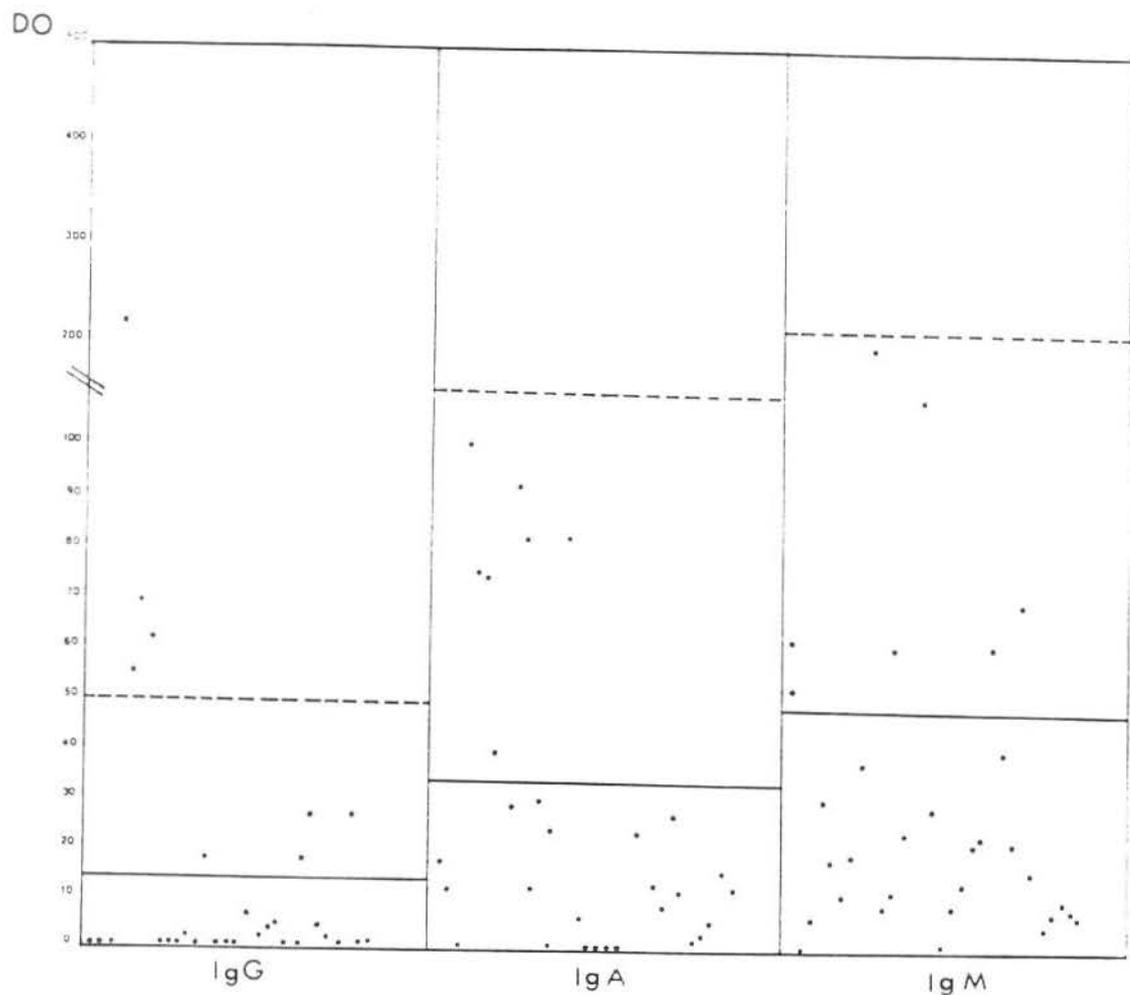


FIGURA 6 - Níveis salivares de imunoglobulinas anti-*Streptococcus mutans* das classes IgG, IgA e IgM nos pacientes com SRB (n=30). Resultados expressos em DO a 492 nm. Cada ponto representa um paciente, a linha contínua a média dos controles e a linha pontilhada a média dos controles somada a dois desvios-padrão.

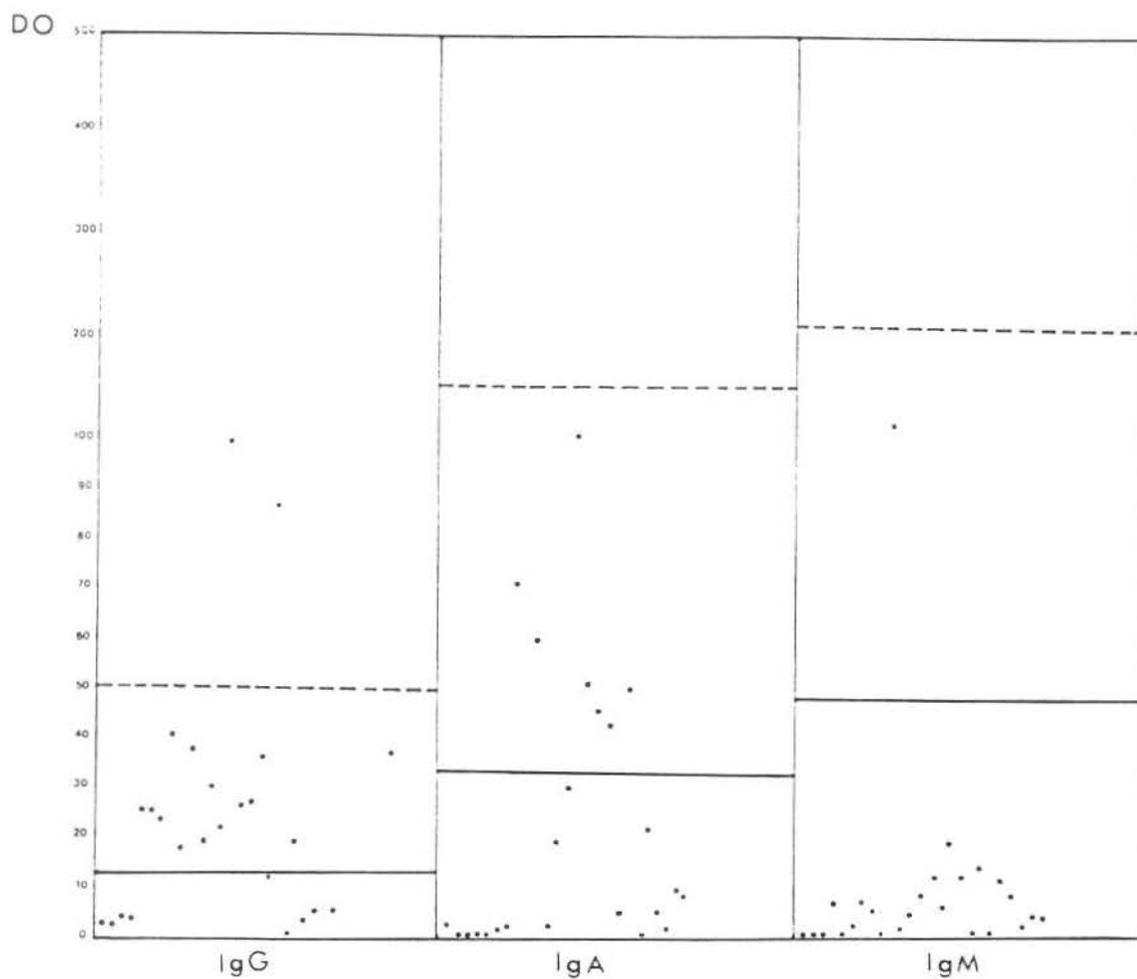


FIGURA 7 - Níveis salivares de imunoglobulinas anti-*Streptococcus mutans* das classes IgG, IgA e IgM nos pacientes do grupo tratado (n=25). Resultados expressos em DO a 492 nm. Cada ponto representa um paciente, a linha contínua a média dos controles e a linha pontilhada a média dos controles somada a dois desvios-padrão.

## 6 DISCUSSÃO

A cárie dentária é uma doença multifatorial que depende da interação de três fatores principais: o hospedeiro, representado pelos dentes e pela saliva; a microbiota e a dieta consumida. Para que ocorra cárie os fatores predisponentes tem que estar presentes e interagir em condições críticas: hospedeiro com dentes susceptíveis, colonizado por microbiota cariogênica e consumindo freqüentemente dieta rica em carboidratos (Weyne<sup>127</sup>, 1992). Microbiota apresentando bactérias cariogênicas e dieta rica em sacarose são pré-requisitos essenciais para o estabelecimento da cárie.

Fatores do hospedeiro como o fluxo salivar, capacidade tampão da saliva, presença de flúor na boca, higiene bucal e desordens locais ou sistêmicas podem aumentar ou diminuir a resistência do hospedeiro, a cariogenicidade da dieta e a virulência das bactérias da microbiota, modulando assim a atividade de cárie (Weine<sup>127</sup>, 1992).

A cárie dentária é uma doença que se estabelece na boca bem antes de manifestar clinicamente sob forma de lesões visíveis. Isto significa que é possível estimar a gravidade da doença cárie em um paciente ou população antes que as lesões de cárie visíveis se desenvolvam (Brathall & Carlsson<sup>9</sup>, 1988).

Nos resultados do presente trabalho, o estudo da microbiota cariogênica e fúngica associado aos testes salivares demonstraram maior predisposição às cáries nos pacientes respiradores bucais, o que nos leva a sugerir que medidas preventivas mais intensas devam ser empregadas nestes

pacientes. Vários autores alertam para a importância da identificação de crianças com alto risco de cárie na população, possibilitando o planejamento de programas preventivos especiais (Crall et al.<sup>20</sup>,1990; Koch<sup>57</sup>, 1988, Brathall e Carlsson<sup>9</sup>, 1988). Por outro lado, poucos trabalhos existem correlacionando a respiração bucal com as contagens de microrganismos na saliva (*Streptococcus mutans*, lactobacilos e fungos), o que torna difícil a discussão dos resultados deste trabalho.

Em adição aos efeitos produzidos no desenvolvimento da face e oclusão, pacientes com síndrome do respirador bucal apresentam alterações locais e sistêmicas que interferem na microbiota bucal. Estas alterações podem levar a um aumento no número de bactérias cariogênicas e conseqüentemente na suscetibilidade às cáries. Aragão<sup>4</sup> (1986) atribuiu o aumento da suscetibilidade às cáries ao maior fluxo de muco das glândulas salivares, que se apondo aos dentes contribuiria para o aumento de bactérias na boca. Além disso, cita o fato de que os pacientes respiradores bucais por serem mais desatentos teriam maior probabilidade de ter uma higiene bucal falha.

Vários autores também relatam maior predisposição e severidade às gengivites (Riar et al.<sup>92</sup>, 1970; Jacobson & Linder-Aronson<sup>42</sup>, 1972; Eslami & Sodeghi<sup>26</sup>,1975). Riar et al.<sup>92</sup> (1970) salientam como fatores predisponentes às gengivites: irritação causada pela constante passagem de ar, a desidratação das mucosas diminuindo a resistência tecidual e a maior viscosidade da saliva com um aumento acentuado na população bacteriana da cavidade bucal.

A contagem de lactobacilos na saliva pode ser usada tanto para a avaliação do risco de cárie como para verificar o efeito das alterações

dietéticas (Krasse<sup>64</sup>, 1986; van Houte<sup>123</sup>, 1993). Os lactobacilos são microrganismos bastante tolerantes a pHs baixos e são considerados potentes acidogênicos. Os números elevados de lactobacilos em lesões de cáries avançadas, indicam que estes microrganismos estão mais relacionados com a progressão do processo de cárie (van Houte<sup>123</sup>, 1993). Vários autores relatam correlação entre altas contagens de lactobacilos e alta atividade de cárie (Crossner<sup>21</sup>, 1981; Krasse<sup>63</sup>, 1988; van Houte<sup>123</sup>, 1993). No presente trabalho, as interpretações de acordo com o número de lactobacilos apresentaram-se semelhantes nos grupos respirador bucal e controle, porém o número de UFC/ml foi maior no grupo respirador bucal em relação aos controles. O grupo tratado apresentou maior número de UFC/ml de saliva, assim como maior número de pacientes com alta atividade de cárie em relação aos demais grupos. Possivelmente devido à faixa etária deste grupo. Tukia-Kulmala & Tenovu<sup>121</sup> (1993), salientam a possibilidade de grande variabilidade nas contagens de microrganismos cariogênicos em adolescentes jovens. A influência da exfoliação dos dentes decíduos e erupção de novas superfícies dentárias pode ser um fator predisponente à diminuição da contagem de lactobacilos. Por outro lado, deve-se também considerar outros fatores que podem levar a um aumento das contagens, tais como mudanças no comportamento, principalmente em relação à higiene; alterações hormonais e fatores dietéticos.

O meio de cultura rotineiramente utilizado para a contagem de lactobacilos é o meio de Rogosa, que graças à presença de um agente tensioativo (Tween 80) e uma mistura de sais especiais, é satisfatoriamente seletivo para este microrganismo. Vários métodos foram propostos buscando alcançar a praticidade e o baixo custo necessários para o uso

clínico. O método da imersão da lâmina (Alaluusua et al.<sup>2</sup>, 1984), apesar de não fornecer valores quantitativos com precisão (Koga et al.\*<sup>1</sup>, 1994) é de fácil execução, sendo indicado para estudos epidemiológicos e uso clínico. O micrométodo proposto por Westergren & Krasse<sup>126</sup> (1977) é útil para a verificação de infecção por lactobacilos. Koga et al.\* (1994) realizaram comparação entre os métodos mais utilizados, verificando que para a obtenção de número confiável de UFC, o mais indicado é o método tradicional.

O teste de Snyder é considerado um método simplificado para medir atividade de cárie, baseando-se na rapidez de formação de ácidos pelas bactérias bucais. Snyder<sup>110</sup> (1940), demonstrou uma relação de proporcionalidade entre a formação de ácidos e o número de lactobacilos presentes na amostra inicial. Segundo Sims<sup>107</sup> (1970), apenas lactobacilos e algumas amostras de fungos são capazes de crescer no meio de Snyder e não todos os microrganismos acidogênicos como acreditavam outros autores. Como a maioria dos fungos não seriam capazes de produzir ácidos o suficiente para causar mudança na coloração do meio (Sims<sup>107</sup>, 1970), considera-se que o teste de Snyder é um meio indireto para se avaliar a quantidade de lactobacilos na saliva.

Alguns autores demonstraram correlação entre teste positivo de Snyder e a atividade clínica de cárie porém, a melhor concordância parece ser entre o teste negativo e ausência de atividade de cárie (Sims<sup>107</sup>, 1970). Deve-se salientar que o teste de Snyder tem sua utilidade na verificação

---

KOGA, C.Y. Testes microbiológicos de atividade de cárie:avaliação de métodos. RGO. (aceito para publicação em setembro de 1994)

aproximada da atividade de cárie, sobretudo devido à sua facilidade de execução. Por outro lado, a sua interpretação é bastante subjetiva o que possivelmente compromete a exatidão dos resultados.

No presente trabalho, o grupo respirador bucal apresentou maior número de pacientes com atividade de cárie acentuada para o teste de Snyder(5). Por outro lado, o grupo controle teve maior porcentagem de pacientes com atividade de cárie negativa (48%), o que vem a reforçar a diferença entre os dois grupos, considerando-se que existe maior confiabilidade no resultado negativo para atividade de cárie. Tais resultados estão de acordo com Fabris et al.<sup>27</sup> (1968) que examinaram a predisposição à cárie em 100 crianças respiradoras bucais e 100 normais através do teste de Snyder, e verificaram maior risco à cárie nos respiradores bucais.

Fiorentini<sup>31</sup> (1969) correlacionaram a terapia ortognática em respiradores bucais com o teste de Snyder, verificando que a atividade de cárie foi diminuindo no decorrer do tratamento. Neste trabalho observamos resultado semelhante, encontrando atividade de cárie acentuada em um número representativamente menor de pacientes do grupo tratado em relação aos respiradores bucais, assim como um aumento no número de pacientes com atividade de cárie negativa. Os trabalhos de Fabris<sup>27</sup> et al. (1968) e Fiorentini<sup>31</sup> (1969) são os únicos que fazem correlação entre pacientes respiradores bucais e testes de atividade de cárie, encontrados na literatura.

Os estreptococos do grupo *mutans* são considerados os agentes etiológicos primários da cárie (Köhler et al.<sup>59</sup>, 1988; Emilson et al.<sup>23</sup>, 1989) e a contagem destes microrganismos utilizada para o diagnóstico do alto risco de cárie. A relação entre número elevado de *Streptococcus mutans* e a

alta atividade de cárie foi comprovada por diversos autores (Newbrun<sup>80</sup>, 1992; Alaluusua<sup>1</sup>, 1993; Anderson<sup>3</sup>, 1993). O nível de *S. mutans* varia com o teor de carboidratos da dieta, portanto sua contagem também é importante na avaliação dietética (van Houte<sup>123</sup>, 1993).

No presente trabalho, o número de UFC/ml de estreptococos do grupo *mutans* foi maior no grupo tratado, apresentando-se semelhantes nos demais grupos. Por outro lado, o número de pacientes com alta atividade de cárie foi maior para crianças respiradoras bucais. Os parâmetros para a avaliação do número de estreptococos do grupo *mutans* são variáveis. Klock & Krasse<sup>55</sup> (1978) demonstraram que pessoas com níveis acima de 10<sup>6</sup> UFC/ml de estreptococos do grupo *mutans* na saliva estavam sob alto risco de cárie. Para estes autores, pacientes com menos de 250.000 estreptococos do grupo *mutans* apresentam baixo risco de desenvolver cáries proximamente. Anderson et al.<sup>3</sup> (1993) consideram de alto risco pacientes que apresentam contagens de estreptococos do grupo *mutans* acima de 100.000 UFC/ml de saliva. Deve-se salientar que a obtenção da média, onde é considerada a soma das contagens de todos os pacientes, pode acarretar perda de significância das altas contagens devidos à diluição destes valores com os de baixas contagens.

Vários métodos tem sido propostos para a contagem de estreptococos do grupo *mutans*. O método da imersão da lâmina tem correlação satisfatória com o método tradicional (Koga et al.<sup>\*</sup>, 1994), sendo indicado para o uso clínico devido à sua facilidade de execução. O método da espátula/língua proposto por Köhler & Brathall<sup>62</sup> (1979) é útil para estimar o nível de infecção por estreptococos, particularmente em estudos epidemiológicos.

Do mesmo modo, o micrométodo (Westergren & Krasse<sup>126</sup>, 1977) apenas verifica a infecção por este microrganismo em limites grosseiros. Na contagem de colônias quando se necessita de precisão, o mais indicado é o método tradicional (Koga et al.<sup>\*</sup>, 1994).

O meio de cultura mais utilizado para o isolamento de *S. mutans* é o ágar Mitis-Salivarius bacitracina sacarose (MSB) (Gold et al.<sup>35</sup>, 1973). Por outro lado, Tanzer & Clive<sup>114</sup> (1986) não consideram este meio ideal para os testes diagnósticos pois tem pequeno período de armazenamento, é parcialmente seletivo e subestima a presença de *mutans*. Estes autores concluíram que análises experimentais são mais confiáveis quando o meio GSTB é utilizado em preferência ao MSB (Tanzer et al.<sup>115</sup>, 1984). Segundo Kimmel & Tinanoff<sup>33</sup>, o MSB superestima a contagem, pois o meio não suprime os estreptococos não *mutans*, podendo levar a falsos positivos. Estes autores concluíram que o MSKB (base de ágar Mitis-Salivarius acrescido de sorbitol, sulfato de kanamicina e bacitracina) é mais seletivo e elimina falsos negativos. Torres et al.<sup>120</sup> (1993) propõe o uso do ágar SB<sub>20</sub> (ágar sacarose bacitracina), concluindo que este é igualmente adequado para o isolamento de estreptococos do grupo *mutans* quando comparado ao MSB. Como o meio utilizado no presente trabalho (MSB) foi sempre o mesmo, foi possível realizar comparações entre as várias contagens. Além disso, foram utilizados vários critérios para interpretar atividade de cárie, o que está de acordo com vários autores (Pienihäkkinen<sup>88</sup>, 1987; Stécksen-Blicks<sup>112</sup>, 1985; Klock & Krasse<sup>54</sup>, 1979; van Houte<sup>123</sup>, 1993).

Segundo Samaranayake<sup>101</sup> (1986), a *Candida albicans* possui características acidogênicas e heterofermentativas, particularmente sob condições ricas em carboidratos, podendo participar deste modo do

processo de cárie. Outras espécies, além da *C. albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*) possuem crescimento marcante em saliva adicionada de glicose, mostrando uma acentuada capacidade acidogênica, levando a uma redução do pH de 7.5 para 3.3 em 72 horas (Samaranayake<sup>102</sup>, 1994). Autores como Pienihäkkinen<sup>89</sup> (1988) e Russel et al.<sup>98</sup> (1991), associaram a contagem de fungos com a atividade de cárie. Leveduras foram encontradas em 33% dos pacientes normais (controle) e no grupo tratado (28%), o que está de acordo com Burford-Mason et al.<sup>14</sup> (1988). Nos respiradores bucais, entretanto, encontramos maior número de pacientes com leveduras (60%). Este fato deve-se possivelmente à alterações na microbiota bucal que podem levar a um aumento de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*, o que poderia alterar o crescimento do gênero *Candida*.

Segundo Pienihäkkinen<sup>89</sup> (1988), indivíduos com mais de 400 UFC/ml de leveduras na saliva apresentam atividade de cárie acentuada. Por outro lado, Olsen & Stenderup<sup>85</sup> (1990), acreditam que pacientes com mais de 400 UFC/ml de saliva possuem candidose crônica ou aguda. Apesar de uma porcentagem representativa de todos os grupos estarem na faixa de atividade de cárie acentuada, nenhum destes apresentou sinais de candidose bucal.

As espécies isoladas de leveduras, *C. albicans*, *C. lusitaniae* e *C. kefyr*, foram comuns nos três grupos. Apenas o grupo respirador bucal apresentou *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*; e o grupo tratado apresentou 2 pacientes com *Candida sp.* A *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada nos três grupos, o que está de acordo com Stenderup<sup>113</sup> (1990). Resultados de trabalho anterior sobre presença de *C. albicans* na saliva de respiradores bucais (Koga et al.<sup>58</sup>, 1993) revelou uma inversão da presença

de *C. albicans* (33,33%) em relação à *Candida sp.* (66,67%). No presente trabalho, não houve esta inversão e a presença das espécies do gênero *Candida* seguiu porcentagens esperadas para o grupo controle, a não ser pela maior variabilidade das espécies. As mudanças quantitativas e qualitativas dos gênero *Candida* podem ser resultado de vários fatores, tais como alterações nutricionais, interações com a microbiota bacteriana e a presença de anticorpos específicos na saliva (Arendorf e Walker<sup>5</sup>, 1980). Tais fatores individuais são possivelmente a causa da diferença dos resultados deste trabalho em relação ao anterior.

Os testes salivares também são bastante utilizados para avaliar a atividade de cárie (Pienihäkkinen<sup>88</sup> 1987; Tukia-Kulmala & Tenovuo<sup>121</sup>, 1993). A saliva exerce importante papel na atividade de cárie devido à sua capacidade tampão, ação anti-bacteriana exercida pela lisozima, lactoferrina e peroxidase; ação de remoção de ácidos da placa, além da presença de IgA secretora (Mandel<sup>74</sup>, 1987). Segundo Brown et al.<sup>10</sup> (1975), a xerostomia leva a cáries rampantes o que indica que mudanças no fluxo salivar podem levar a alterações na composição bacteriana da placa, podendo interferir no potencial cariogênico.

No presente trabalho, o grupo controle apresentou média de fluxo salivar igual a 1,83 ml/min., o que está de acordo com Crossner<sup>21</sup> (1981), que estudando o fluxo salivar em 118 crianças obteve média de 1,9-2,2 ml/min. O grupo respirador bucal foi o que apresentou maior média em relação aos controles, sugerindo que o ressecamento da mucosa leve a um mecanismo compensatório. O grupo tratado apresentou média intermediária mas com resultados estatisticamente significante em relação ao grupo respirador bucal.

A capacidade tampão da saliva é a propriedade de neutralizar os ácidos produzidos pelos microrganismos da placa, colaborando para que o pH da boca não ultrapasse os limites críticos. Esta propriedade se deve primariamente à ação dos tampões bicarbonato e fosfato presentes na saliva (Mandel<sup>94</sup>, 1987). Os valores obtidos para a capacidade tampão da saliva foram menores no grupo respirador bucal e no tratado. Apesar disso, as médias dos pHs para todos os grupos encontram-se dentro do padrão de normalidade. Para crianças na faixa etária em estudo, o fluxo salivar e a capacidade tampão da saliva são muito variáveis, principalmente devido às alterações provocadas pela troca dos dentes decíduos pelos permanentes (Tukia-Kulmala & Tenovuo<sup>121</sup>, 1993).

Vários autores (Pienihakkinen<sup>88</sup>, 1987; Stécksen-Blicks<sup>112</sup>, 1984; Klock & Krasse<sup>54</sup>, 1979; van Houte<sup>123</sup>, 1993), salientam a importância da combinação de vários testes para se obter um diagnóstico final sobre atividade de cárie. O uso de um teste isoladamente pode levar a resultados errados, principalmente devido à subjetividade dos mesmos e de suas interpretações. Várias críticas e limitações são feitas para cada teste, principalmente as contagens de microrganismos bucais, pois a microbiota é extremamente variável entre indivíduos, além do número de microrganismos ser muito grande, o que por vezes torna a interpretação difícil. Por este motivo, utilizamos no presente trabalho escores para que pudessemos obter a soma de todas as interpretações e assim poder comparar os grupos (Tabela 11, p.53). Segundo Alaluusua<sup>1</sup> (1993), o uso de escores diminui a subjetividade e facilita a interpretação dos resultados. O grupo respirador bucal apresentou média dos escores superior e com diferença significativa em relação ao grupo tratado e ao grupo controle.

Segundo Loesche<sup>72</sup> (1993), as imunoglobulinas IgA, IgG e IgM anti-*Streptococcus mutans* estão implicadas na imunidade à cárie. Vários autores tem relatado níveis de IgA salivar anti-*Streptococcus mutans* maiores em indivíduos cáries-resistentes do que em suscetíveis à cárie (Kennedy et al.<sup>50</sup>, 1968; Bolton & Hlava<sup>7</sup>, 1982; Gregory<sup>37</sup>, 1990), sugerindo uma ação protetora. A IgM parece estar relacionada a algum grau de imunidade à cárie nos casos de deficiência seletiva de IgA. Vários estudos (Butler et al.<sup>15</sup>, 1990; Lehner<sup>69</sup>, 1978; Gregory<sup>37</sup>, 1990) têm demonstrado a relação entre baixa experiência de cárie e o nível de IgG sérico anti-*S. mutans* o que parece ser importante devido à sua presença no fluido gengival.

No presente trabalho, o grupo controle apresentou valores mais elevados para a IgA e IgM anti-*S. mutans* em relação aos demais grupos. A presença constante e elevada *S. mutans* na boca dos pacientes com SRB pode ter levado a uma supressão dos anticorpos salivares. Os valores de IgG foram mais altos no grupo tratado.

Vários autores (Camling et al.<sup>16</sup>, 1987; Gregory et al.<sup>37</sup>, 1990; Kent et al.<sup>51</sup>, 1992; Winderström et al.<sup>129</sup>, 1992), utilizam como antígenos células totais de *S. mutans*, obtendo resultados bem superiores aos encontrados neste trabalho onde o antígeno utilizado foi citoplasmático. Por outro lado, a utilização de células inteiras pode levar a reações cruzadas com outros tipos de *Streptococcus* e conseqüentemente a falsos positivos (Camling et al.<sup>16</sup>, 1987; Bolton & Hlava<sup>7</sup>, 1982).

Os anticorpos séricos e secretórios fazem parte dos fatores imunes específicos ligados à infecção pela *Candida*. A IgA parece exercer papel importante, prevenindo a sua adesão à mucosa (Heimdahl & Nord<sup>39</sup>, 1990).

No presente trabalho, observou-se nível mais elevado de IgA e IgM no grupo controle, seguido pelos respiradores bucais e tratado. O maior valor no grupo tratado, possivelmente pode ser devido à infecções por *Candida* em outros locais do organismo já que estes indivíduos apresentaram um menor número destes microrganismos na cavidade bucal.

Observa-se grande variabilidade das DO para as imunoglobulinas, o que também foi observada por Bolton & Hlava<sup>7</sup> (1982), possivelmente devido às variações individuais próprias. Esta variabilidade pode levar à falsas interpretações das médias devido à diluição dos altos e baixos valores. Foi utilizada além da média, a mediana para cada grupo, a fim de facilitar a verificação real dos resultados.

Os resultados deste trabalho demonstram que os respiradores bucais apresentam alterações da microbiota bucal que favorecem o desenvolvimento de microrganismos cariogênicos e leveduras e o estabelecimento de placa cariogênica específica (Emilson & Krasse<sup>22</sup>, 1985). Além disso, estes indivíduos apresentam níveis menores de IgA e IgM salivar, o que pode diminuir a resistência às cáries. Assim estes pacientes são mais suscetíveis às cáries. Aparentemente, a atividade de cárie tende a diminuir a níveis semelhantes ao dos controles após tratamento ortodôntico e/ou fonoaudiológico.

Como existem poucos trabalhos na literatura sobre o assunto, acreditamos ser necessários mais estudos, principalmente relacionando os nossos achados com a análise clínica do paciente respirador bucal. O aspecto primordial para a prevenção da cárie nestes pacientes parece ser a conscientização dos mesmos, dos ortodontistas e fonoaudiólogos no sentido de manter ótimos hábitos de higiene bucal.

## 7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados neste trabalho foram feitas as seguintes conclusões:

- O número de estreptococos do grupo *mutans* foi maior e significativo no grupo respirador bucal (n=30) em relação aos grupos controle (n=30) e tratado (n=25). O grupo SRB apresentou maior número de leveduras em relação aos outros grupos, os quais apresentaram valores semelhantes. O número de lactobacilos foi maior no grupo tratado.
- O grupo respirador bucal apresentou valor maior e significativo para a soma dos escores obtidos a partir da interpretação de todos os testes realizados.
- O grupo respirador bucal apresentou maior número de leveduras na saliva. A espécie mais encontrada foi a *Candida albicans* (76,92%). No grupo controle foram encontrados também *C. lusitaniae* e *C. kefir* e no grupo respirador bucal foram encontradas 2 amostras de *C. lusitaniae* e 1 de *C. kefir*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*.
- O grupo controle apresentou maior quantidade de IgA e IgM anti-*Streptococcus mutans* na saliva, seguido pelo grupo respirador bucal e tratado. O grupo tratado apresentou valores mais elevados de IgG anti-S.

*mutans*. Maior quantidade de IgA e IgM anti-*Candida* também foi verificada nos controles, seguida pelos outros grupos, enquanto o grupo tratado apresentou maior quantidade de IgG anti-*Candida*.

**ANEXO 1** Modelo da autorização para a coleta das amostras.

Faculdade de Odontologia, Câmpus de São José dos Campos/UNESP

**AUTORIZAÇÃO PARA A COLETA DE AMOSTRAS**

PACIENTE:.....nº .....

RESPONSÁVEL: .....

Por este instrumento de autorização por mim assinado, dou pleno consentimento à Faculdade de Odontologia, Câmpus de São José dos Campos/UNESP para, por intermédio de seus professores e alunos devidamente autorizados, fazer diagnóstico, planejamento, tratamento e coleta de amostras.

Tenho pleno conhecimento que as clínicas e laboratórios desta instituição, tem como principal objetivo a instrução e demonstração pra estudantes de Odontologia. Concordo com toda a orientação seguida, quer para fins didáticos, de diagnóstico, pesquisa e/ou tratamento.

Concordo plenamente também, que todas as radiografias, fotografias, históricos de antecedentes familiares, resultados de exames clínicos e de laboratório e informações concernentes ao planejamento de diagnóstico e/ou tratamento, constituem propriedades exclusivas desta Faculdade, à qual dou plenos direitos de retenção e uso para quaisquer fins de ensino, pesquisa, divulgação em jornais e/ou revistas científicas.

São José dos Campos, de de 19 .

\_\_\_\_\_  
PAI OU RESPONSÁVEL

R.G.: \_\_\_\_\_

C.I.C.: \_\_\_\_\_



Interpretação:

TESTE DE FLUXO SALIVAR:  
DA SALIVA

Saliva : \_\_\_\_\_ ml  
Tempo: \_\_\_\_\_ min  
Total : \_\_\_\_\_ ml/min  
Interpretação : \_\_\_\_\_

CAPACIDADE TAMPÃO

pH final: \_\_\_\_\_  
Interpretação : \_\_\_\_\_

OBS.:

**ANEXO 3 - Ficha individual preenchida para cada paciente do grupo tratado.**

NOME : \_\_\_\_\_ Nº : \_\_\_\_\_

ENDEREÇO :

\_\_\_\_\_

TELEFONE : \_\_\_\_\_

FILIAÇÃO : \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

IDADE : \_\_\_\_\_ DATA DE NASCIMENTO : \_\_\_\_\_

- DIAGNÓSTICO RESPIRADOR BUCAL : \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

- TRATAMENTO :

FONOAUDIOLOGIA  NÃO  SIM

DATA INÍCIO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

DATA TÉRMINO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

ORTODONTIA:  NÃO  SIM

DATA INÍCIO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

DATA TÉRMINO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

- COLETA APÓS \_\_\_\_\_ DO TRATAMENTO.

**ANEXO 4 -** Dados referentes ao diagnóstico, duração do tratamento ortodôntico e/ou fonoaudiológico e tempo entre término do tratamento e a coleta.

PACIENTE	DIAGNÓSTICO RB ( mês/ano)	DURAÇÃO DO TRATAMENTO	COLETA APÓS TRATAMENTO (ano/meses)
1	03/93	fonoaudiológico (8 meses)	1 mês
2	05/91	fonoaudiológico (2 anos e 5 meses) ortodôntico (3 anos)	1 mês
3	05/90	fonoaudiológico (2 anos e 6 meses) ortodôntico (5 anos)	1 mês
4	11/91	fonoaudiológico (1 ano e 7 meses) ortodôntico (2 anos)	5 meses
5	03/92	fonoaudiológico (1 ano e 3 meses)	5 meses
6	08/92	fonoaudiológico (9 meses) ortodôntico (1 ano)	5 meses
7	12/89	fonoaudiológico (3 anos e 7 meses)	3 meses
8	07/91	fonoaudiológico (1 ano) ortodôntico (2 anos)	9 meses
9	01/90	fonaudiológico (7 meses) ortodôntico (3 anos)	3 anos e 5 meses
10	08/92	fonoaudiológico (5 meses) ortodôntico (1 ano e 8 meses)	10 meses

PACIENTE	DIAGNÓSTICO RB (mês/ano)	DURAÇÃO DO TRATAMENTO	COLETA APÓS TRATAMENTO (ano/meses)
11	08/91	fonoaudiológico (1 ano)	1 ano e 8 meses
12	12/89	fonoaudiológico (2 anos) ortodôntico (4 anos)	4 meses
13	05/91	fonoaudiológico (6 meses)	3 anos e 5 meses
14	03/93	fonoaudiológico (9 meses)	4 meses
15	09/91	fonoaudiológico (8 meses)	2 anos
16	05/91	fonoaudiológico (14 meses)	10 meses
17	03/93	fonoaudiológico (6 meses)	9 meses
18	08/92	fonoaudiológico (1 ano) ortodôntico (7 anos)	2 anos
19	11/91	fonoaudiológico (7 meses)	2 anos
20	11/90	fonoaudiológico (1 ano) ortodôntico (2 anos)	1 ano
21	09/90	fonoaudiológico (3anos) ortodôntico (4 anos)	9 meses
22	06/91	fonoaudiológico (11 meses)	2 anos e 5 meses

PACIENTE	DIAGNÓSTICO RB (mês/ano)	DURAÇÃO DO TRATAMENTO	COLETA APÓS TRATAMENTO (ano/meses)
23	04/92	fonoaudiológico (7 meses) ortodôntico (1 ano)	1 ano e 5 meses
24	11/90	fonoaudiológico (3 meses)	1 ano e 11 meses
25	05.91	fonoaudiológico (9 meses) ortodôntico (1 ano)	11 meses

**ANEXO 5** - Tabelas com os valores de DO para anticorpos IgA, IgG e IgM anti-*Streptococcus mutans* e anti-*Candida* na saliva de pacientes dos grupos controle, respirador bucal e tratado.

Tabela 18 - Valores de DO para IgA anti-*Streptococcus mutans* nos grupos controle (n=30), respiradores bucais (n=30) e tratado (n=25). O porcentual de aumento foi calculado a partir da média dos controles.

PACIENTES	CONTROLES	RESPIRADORES BUCAIS		TRATADO	
	DO	DO	% aumento	DO	% aumento
1	3	17	47,62	3	8,40
2	26	12	33,61	1	2,80
3	17	1	2,80	1	2,80
4	21	110	308,12	1	2,80
5	58	76	212,89	1	2,80
6	16	75	210,08	3	8,40
7	31	40	112,04	3	8,40
8	21	29	81,23	72	201,68
9	36	93	260,50	1	2,80
10	356	12	33,61	61	170,87
11	11	30	84,03	3	8,40
12	4	1	2,80	20	56,02
13	10	24	67,2	31	86,83
14	14	83	232,49	104	291,32
15	21	6	16,80	52	145,66
16	92	1	2,80	47	131,65
17	29	1	2,80	44	123,23
18	2	1	2,80	6	16,80
19	11	1	2,80	51	142,86
20	17	2	5,60	1	2,80
21	30	24	67,2	22	61,62
22	34	13	36,41	6	16,81
23	14	9	25,21	2	2,80
24	22	27	75,63	5	14
25	23	12	33,61	4	11,20
26	26	2	5,61		
27	76	3	8,40		
28	1	6	16,80		
29	26	15	42,02		
30	23	13	36,41		
Média + DP	35,7 + 63,7	24,6 + 30,8	69,0 + 86,3	21,8 + 28,4	61,0 + 79,5

Tabela 19 - Valores de DO para IgM anti-*Streptococcus mutans* nos grupos controle (n=30), respiradores bucais (n=30) e tratado (n=25). O porcentual de aumento foi calculado a partir da média dos controles.

PACIENTES	CONTROLES	RESPIRADORES BUCAIS		TRATADO	
	DO	DO	% aumento	DO	% aumento
1	27	63	124,75	1	1,98
2	83	1	1,98	1	1,98
3	94	7	13,86	1	1,98
4	76	31	61,39	8	15,84
5	12	18	35,64	1	1,98
6	22	12	23,76	3	5,94
7	78	20	39,60	8	15,84
8	17	38	75,25	6	11,88
9	25	202	400	1	1,98
10	464	9	17,82	119	235,6
11	16	12	27,76	3	5,94
12	85	24	47,52	5	9,9
13	80	31	61	9	17,82
14	1	153	302,97	13	25,74
15	1	29	57,43	7	13,86
16	72	1	1,98	20	39,6
17	46	9	17,82	13	25,74
18	38	14	27,72	1	1,98
19	1	21	41,58	15	29,7
20	1	23	45,54	1	1,98
21	90	31	61	12	23,76
22	1	40	79,21	9	17,82
23	1	22	43,56	2	3,96
24	65	70	138,61	5	9,90
25	1	16	31,68	4	7,92
26	12	5	9,90		
27	1	8	15,84		
28	1	10	19,80		
29	17	8	15,84		
30	86	7	13,86		
Média + DP	50,5 + 85,4	31,2 + 43,4	61,8 + 86,0	10,7 + 13,2	21,2 + 45,8

Tabela 20 - Valores de DO para IgG anti-*Streptococcus mutans* nos grupos controle (n=30), respiradores bucais (n=30) e tratado (n=25). O porcentual de aumento foi calculado a partir da média dos controles.

PACIENTES	CONTROLES	RESPIRADORES BUCAIS		TRATADO	
	DO	DO	% aumento	DO	% aumento
1	11	1	6,41	3	19,23
2	32	1	6,41	3	19,23
3	1	1	6,41	5	32,05
4	3	222	1423,08	4	25,64
5	1	55	352,56	26	166,67
6	1	69	442,30	26	166,67
7	1	62	397,43	24	153,85
8	1	1	6,41	42	269,23
9	1	1	6,41	19	121,79
10	68	1	6,41	39	250
11	2	2	12,82	20	128,20
12	12	1	6,41	31	198,72
13	16	18	115	23	147,44
14	16	1	6,41	100	641,03
15	36	1	6,41	27	173,08
16	59	1	6,41	28	179,49
17	11	7	44,87	37	237,18
18	28	3	19,23	13	83,33
19	40	4	25,64	87	557,69
20	20	5	32,05	1	6,41
21	10	18	115	24	153,84
22	19	1	6,41	3	19,23
23	1	1	6,41	5	32,05
24	7	32	205,13	10	64,1
25	38	5	32,05	5	32,05
26	22	2	12,82		
27	7	1	6,41		
28	1	27	173,08		
29	1	1	6,41		
30	1	1	6,41		
Média + DP	15,6 + 18,0	18,2 + 43,0	117 + 275	24,2 + 24,4	155 + 156

Tabela 21 - Valores de DO para IgA anti-*Candida* nos grupos controle (n=30), respiradores bucais (n=30) e tratado (n=25). O porcentual de aumento foi calculado a partir da média dos controles.

PACIENTES	CONTROLES	RESPIRADORES BUCAIS		TRATADO	
	DO	DO	% aumento	DO	% aumento
1	1	9	6,92	99	76,15
2	142	15	11,54	1	0,77
3	8	1	0,77	2	1,54
4	128	10	7,69	7	5,38
5	50	86	66,15	8	6,15
6	34	43	33,08	57	43,85
7	110	53	40,77	37	28,46
8	31	17	13,08	221	170
9	51	12	9,23	26	20
10	906	504	387,69	520	400
11	20	16	12,31	76	58,46
12	20	52	40	22	16,92
13	36	92	70,70	36	27,69
14	49	697	536,15	120	92,31
15	11	41	31,54	54	41,54
16	160	1	0,77	1	0,77
17	35	14	10,77	93	71,54
18	16	3	2,31	7	5,38
19	74	3	2,31	1	0,77
20	101	1	0,77	1	0,77
21	56	92	70,70	61	46,92
22	121	11	8,42	14	10,76
23	39	151	116,15	24	18,46
24	37	37	28,46	11	8,46
25	102	392	301,54	44	33,84
26	162	3	2,31		
27	38	66	50,77		
28	12	319	245,38		
29	1274	4	3,08		
30	79	1	0,77		
Média + DP	130 + 269	91,5 + 167	70,4 + 128	61,7 + 108	47,5 + 83

Tabela 22 - Valores de DO para IgM anti-*Candida* nos grupos controle (n=30), respiradores bucais (n=30) e tratado (n=25). O percentual de aumento foi calculado a partir da média dos controles.

PACIENTES	CONTROLES	RESPIRADORES BUCAIS		TRATADO	
	DO	DO	% aumento	DO	% aumento
1	15	45	47,02	33	34,48
2	96	1	1,04	26	27,17
3	53	9	9,4	1	1,04
4	94	35	36,57	11	11,49
5	11	9	9,4	3	3,13
6	19	6	6,27	26	27,17
7	128	23	24,03	18	18,81
8	22	20	2,09	74	77,32
9	20	839	876,7	10	10,45
10	1453	1	1,04	288	300,94
11	17	30	3,13	35	36,57
12	73	453	473,35	33	34,48
13	200	60	6,27	22	22,99
14	17	24	25,08	31	32,39
15	18	11	11,49	15	15,67
16	91	1	1,04	29	30,3
17	35	1	1,04	71	74,2
18	21	1	1,04	6	6,27
19	28	18	18,81	92	96,13
20	20	19	19,85	3	3,13
21	30	60	6,27	36	37,62
22	30	30	3,13	9	9,4
23	2	77	80,46	7	7,31
24	28	0	0	8	8,36
25	27	8	8,36	12	12,54
26	23	35	36,57		
27	24	1	1,04		
28	10	1	1,04		
29	156	1	1,04		
30	111	1	1,04		
Média + DP	95.7 + 261	60.7 + 168	57.1 + 177	36.0 + 57.4	37.6 + 60,0

Tabela 23 - Valores de DO para IgG anti-*Candida* nos grupos controle (n=30), respiradores bucais (n=30) e tratado (n=25). O percentual de aumento foi calculado a partir da média dos controles.

PACIENTES	CONTROLES	RESPIRADORES BUCAIS		TRATADO	
	DO	DO	% aumento	DO	% aumento
1	18	28	57,73	46	94,84
2	84	2	4,12	1	2,06
3	11	7	14,43	1	2,06
4	5	201	414,43	50	103,09
5	15	71	146,39	23	47,42
6	9	62	127,83	9	18,56
7	15	21	43,30	14	28,87
8	33	28	57,73	93	191,75
9	37	10	20,62	51	105,15
10	114	33	68,04	227	468,04
11	9	190	391,75	14	28,87
12	1	355	731,96	15	30,93
13	37	49	101,03	8	16,49
14	7	3	6,19	82	169,07
15	13	1	2,06	39	80,41
16	90	4	8,25	8	16,49
17	20	1	2,06	35	72,16
18	11	4	8,25	3	6,19
19	51	28	57,73	970	2000
20	31	30	61,86	1	2,06
21	42	49	101,03	71	146,39
22	329	18	37,11	5	10,31
23	11	157	323,71	4	8,25
24	37	19	39,18	2	4,12
25	30	26	53,61	4	8,25
26	20	27	55,67		
27	15	9	18,56		
28	1	25	51,55		
29	320	10	20,62		
30	39	4	8,25		
Média + DP	48,5 + 79,6	49,1 + 78,1	97,3 + 161	71,0 + 193	146 + 399

TESTES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	MEDIA DP	
<b>Fluxo salivar</b>																																
- medida (ml/min)	6,0	0,9	0,4	0,6	1,2	0,3	0,4	0,8	3,9	4,0	3,6	1,3	1,6	0,9	0,8	2,5	2,0	2,5	2,2	0,7	2,4	2,5	2,0	0,9	0,8	3,7	2,4	1,7	2,0	2,1	X= 1,85 ± 1,66	
- escore	0	0	2	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X= 0,28 ± 0,71
<b>Capacidade tampão da saliva</b>																																
- pH	7,2	6,4	6,0	5,2	6,9	6,0	6,8	6,3	5,5	6,0	6,3	5,8	6,1	6,6	5,8	5,6	5,4	5,6	5,0	5,9	5,6	5,9	6,3	5,1	5,8	5,9	7,8	6,5	6,0	6,1	X= 6,57 ± 0,78	
- escore	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	X= 0	
<b>Snyder</b>																																
- escore	2	2	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	2	2	2	2	2	0	0	0	3	0	0	0	X= 0,83 ± 1,02	
<b>Lactobacilos</b>																																
- número (10 <sup>3</sup> UFC/ml)	0	0,01	0	0	0	0,36	1,5	0,75	0	0	0	0	0	0	0	12	2,7	4,1	5,5	5,0	3,5	1,1	610	0,2	0,4	0,4	320	1,2	0,05	66		
- log. n° céls.	0	1	0	0	0	2,6	3,2	2,9	0	0	0	0	0	0	0	3,3	3,4	3,6	3,7	3,7	3,5	3,0	5,8	2,2	2,6	2,6	4,5	3,1	1,7	4,8	X= 1,95 ± 1,75	
- escore	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	1	2	1	1	1	3	0	0	0	3	1	0	2	X= 0,62 ± 0,98	
<b>Grupo "mutans"</b>																																
- número (10 <sup>4</sup> UFC/ml)	1,5	1,2	1,3	2,4	0,13	10	8,9	1,3	5,6	3,7	5,6	2,1	5,2	1300	24	110	47	19	30	7,2	3,8	5,3	1,1	0,1	2,1	11	1,3	4,7	5,4	6,8		
- log. n° céls	4,2	4,1	5,1	4,4	3,1	5,0	4,9	4,1	4,8	5,6	4,8	4,3	4,7	7,1	5,4	6,0	5,7	5,3	5,5	4,9	4,6	4,7	4,0	3,0	4,3	5,0	4,1	5,7	5,7	5,8	X= 4,85 ± 0,83	
- escore	0	0	3	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	3	0	3	3	3	X= 1,3 ± 1,51	
<b>Leveduras</b>																																
- número (10 <sup>3</sup> UFC/ml)	0	1,0	0	0	0,2	0,03	0,88	0	0,6	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	1,9	0	1,0	0,5	0	0	0,01	1,4	0	0	0,04	0,01		
- log. n° céls	0	3	0	0	2,3	1,5	2,9	0	2,8	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3,3	0	3	4,7	0	0	1	3,2	0	0	1,6	1	X= 1,11 ± 1,45	
- escore	0	3	0	0	2	1	3	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	3	3	0	0	1	3	0	0	1	1	X= 0,93 ± 1,28	
<b>Soma dos escores</b>	2	5	5	0	2	7	7	1	3	3	0	0	0	3	4	8	6	4	10	3	6	6	5	0	1	6	6	4	4	6	T= 117	
<b>Médias DP (escores)</b>	0,3± 0,8	0,8± 0,8	0,8± 0	0,3± 0,8	1,2± 1,3	1,3± 0,2	0,2± 0,5	0,5± 0	0	0	0	0	0	0	0,5± 1,2	0,7± 1,2	1,7± 1,3	1± 1,2	0,7± 1,2	1,5± 0,8	0,5± 1±	1± 0,8	0,8± 0	0,6± 1±	1± 0,7	0,7± 1,2	0,7± 1,2	1,2± 1,3		X= 3,9 ± 2,7		

ANEXO 6 - Resultados individuais dos testes microbiológicos e salivares no grupo controle. Para cada paciente estão expressos os resultados e os escores atribuídos para cada teste, com as respectivas médias e desvios-padrão.

TESTES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	MEDIA	DP		
<b>Fluxo salivar</b>																																		
- medida (ml/min)	0,6	2,3	1,0	1,5	4,0	1,0	1,1	2,8	3,6	3,6	1,2	1,9	0,8	1,9	1,7	0,2	0,4	0,9	1,1	8,3	0,9	4,0	0,4	2,9	1,2	0,4	1,3	0,8	1,4	0,3			X= 2,23 ± 1,37	
- escore	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	2			X= 0,34 ± 0,77	
<b>Capacidade tampão da saliva</b>																																		
- pH	7,0	5,6	7,3	7,2	7,2	7,1	6,2	6,9	5,0	7,0	6,4	6,5	5,9	7,2	6,1	4,0	6,5	7,7	7,0	6,7	7,0	7,3	6,5	6,5	7,1	6,0	6,1	7,2	6,1	5,9			X= 6,04 ± 0,78	
- escore	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			X= 0,06 ± 0,26
<b>Snyder</b>																																		
- escore	3	3	0	0	0	0	0	3	0	0	2	1	0	0	1	1	1	2	2	3	1	1	2	2	2	2	3	1	2	1			X= 1,30 ± 1,09	
<b>Lactobacilos</b>																																		
- número (10 <sup>3</sup> UFC/ml)	38	1,0	0	0	19	0	0	9,2	9,7	0,1	0,7	1,1	0,1	0	1,1	1,2	2,5	2,5	220	0,2	0	0	1200	0,9	0,1	0,1	0,07	0,01	0	0				
- log. n° céls.	4,6	3,0	0	0	2,3			4,0	4,0	2,1	2,8	3,0	2,1		3,0	3,1	3,4	4,4	5,3	2,2			5,1	2,9	2,0	3,1	1,8	1,0	0				X= 2,30 ± 1,65	
- escore	3	1	0	0	0			2	2	0	0	1	0		1	1	1	3	3	0			3	0	1	1	0	0	0				X= 0,77 ± 1,07	
<b>Grupo "mutans"</b>																																		
- número (10 <sup>3</sup> UFC/ml)	100	310	180	260	10	190	90	340	100	130	240	300	320	5,5	7,2	0,3	46	28	13	23	10	510	150	21	780	120	110	120	250	100				
- log. n° céls	5,0	5,5	5,2	5,4	4,0	5,3	4,9	5,5	5,0	5,1	5,4	5,5	5,5	3,7	4,8	2,4	4,7	4,5	4,1	4,4	5,0	5,7	5,2	4,3	6,0	5,1	5,0	5,1	5,4	5,0			X= 4,93 ± 0,70	
- escore	3	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3			X= 2,1 ± 1,41
<b>Leveduras</b>																																		
- número (10 <sup>2</sup> UFC/ml)	0	0,01	0	0	0	0	210	0,6	0	0	3,7	140	0	21	23	0	0	1,0	0	1,0	0	1,9	0	820	120	9,0	0,4	0,3	25					
- log. n° céls	0	1	0	0	0	0	3,3	3,7	0	0	2,6	3,1	0	3,3	3,4	0	0	2	0	2	0	2,3	0	4,9	4,1	2,9	1,6	1,5	3,4				X= 1,44 ± 1,61	
- escore	0	1	0	0	0	0	3	3	0	0	2	3	0	3	3	0	0	1	0	1	0	2	0	3	3	3	1	1	3				X= 1,2 ± 1,32	
<b>Soma dos escores</b>	9	8	3	3	3	3	0	11	9	3	5	7	6	0	5	8	4	5	6	3	4	4	12	2	9	11	9	5	6	9			T= 172	
<b>Médias DP (escores)</b>	1,5± 1,3±	0,5± 0,5±	0,5± 0,5±	0,5± 0,5±	0	1,7± 1,5±	0,5± 0,8±	1,3± 1±	0	0,8± 1,3±	0,7± 0,8±	1± 0,5±	0,8± 1±	2± 0,3±	1,5± 1,8±	1,5± 0,8±	1± 1,5±	1,8± 1,5±	0,8± 1±	1,5± 1,6±	1,5± 1,4±													X= 5,73 ± 3,19
	1,6	1,4	1,2	1,2	1,2	1,2		1,4	1,4	1,2	1,3	1,4	1,5		1,2	1,0	0,8	1,3	1,3	1,2	1,2	1,3	1,1	0,8	1,4	1,2	1,6	1,2	1,3	1,4				

ANEXO 7 - Resultados individuais dos testes microbiológicos e salivares no grupo respirador bucal. Para cada paciente estão expressos os resultados e os escores atribuídos para cada teste, com as respectivas médias e desvios-padrão.

TESTES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	MEDIA DP	
<b>Fluxo salivar</b>																											
- medida (ml/min)	1,2	2,3	1,0	1,1	0,9	1,6	1,7	2,5	1,4	1,0	1,3	1,3	1,5	1,8	1,8	1,3	1,1	2,3	1,5	0,4	0,9	2,3	2,8	1,8	3,4	X= 1,61 ± 0,68	
- escore	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	X= 0,04 ± 0,20	
<b>Capacidade tampão da saliva</b>																											
- pH	6,0	6,5	7,0	7,0	6,0	7,0	6,2	6,6	6,4	6,4	6,9	6,0	6,3	6,8	5,0	5,2	7,0	5,6	6,8	5,9	5,7	2,0	4,3	5,0	6,5	X= 6,04 ± 1,11	
- escore	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	X= 1,60 ± 0,62	
<b>Snyder</b>																											
- escore	3	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	2	2	1	1	2	2	3	0	X= 0,96 ± 1,06	
<b>Lactobacilos</b>																											
- número (10 <sup>3</sup> UFC/ml)	440	66	4,5	0	0	0	2	4	0,08	0,02	0	5,3	0	29	4	10	14	0,04	62	83	1,3	5,5	0	39	0		
- log. n° céls.	5,6	4,8	1,7	0	0	0	3,3	3,6	1,9	2,3	0	3,7	0	4,5	3,6	1	4,5	2,6	4,8	4,9	4,1	3,7	0	4,6	0	X= 2,61 ± 1,98	
- escore	3	3	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0	3	1	0	3	0	3	3	3	2	0	3	0	X= 1,24 ± 1,36	
<b>Grupo "mutans"</b>																											
- número (10 <sup>3</sup> UFC/ml)	29	11	2,0	16	13	1,5	12	13	6	9	0,3	2,2	0,7	11	5,6	0,1	0,09	0,8	14	36	0,1	1,1	0,6	1,8	1,5		
- log. n° céls	6,5	6,0	5,3	6,2	6,1	5,2	6,1	6,1	5,8	6,0	4,4	5,4	4,9	6,0	5,8	4,1	3,9	4,9	6,1	6,6	4,1	5,0	4,7	5,3	5,2	X= 5,43 ± 0,78	
- escore	3	3	0	3	3	0	3	3	3	3	0	0	0	3	3	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	
<b>Leveduras</b>																											
- número (10 <sup>3</sup> UFC/ml)	110	0	5	0	0	0	0	280	0	0	0	5,4	0	600	0	0	0,04	0	0	160	0	0	0	1,1	0		
- log. n° céls	4,0	0	2,7	0	0	0	0	4,5	0	0	0	2,7	0	4,8	0	0	1,6	0	0	4,2	0	0	0	3,0	0	X= 1,10 ± 1,74	
- escore	3	0	3	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0	3	0	0	1	0	0	3	0	0	0	3	0	X= 0,88 ± 1,36	
<b>Soma dos escores</b>	12	8	3	3	3	0	6	7	3	3	0	5	0	10	6	0	5	2	5	12	4	7	3	9	0	T= 116	
<b>Médias DP (escores)</b>	2,0± 1,5	1,3± 1,5	0,5± 1,2	0,5± 1,2	0,5± 1,2	0	1,0± 1,3	1,2± 1,5	0,5± 1,2	0,5± 1,2	0	0,8± 1,3	0	1,7± 1,5	1,0± 1,3	0	0,8± 1,2	0,3± 0,8	1,3± 1,5	2,0± 1,3	0,7± 1,2	1,2± 1,3	0,5± 0,8	1,5	0	X= 4,64 ± 3,62	

**ANEXO 8** - Resultados individuais dos testes microbiológicos e salivares no grupo tratado. Para cada paciente estão expressos os resultados e os escores atribuídos para cada teste, com as respectivas médias e desvios-padrão.

KOGA, C.Y. Quantitation of cariogenic and fungal microbiota and antibodies against *Candida* and *Streptococcus mutans* in mouthbreathing syndrome patients saliva. Piracicaba, 1995. 125p. Tese (Mestrado em Biologia e Patologia Buco-Dental) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

### SUMMARY

Oral breathing syndrome causes modifications in the oral cavity and in oral microbiota elevating the susceptibility to dental caries and other infections. The aim of this study was to compare cariogenic and fungal microbiota in the saliva of control children and mouthbreathers before and after treatment. We studied 30 control children, 30 mouthbreathers and 25 treated patients performing the quantitation of *Lactobacillus*, *mutans* group *Streptococcus* and yeasts; Snyder's test and evaluation of salivary flow and buffering capacity. It was also quantified immunoglobulins against *Candida* and *Streptococcus mutans* in the saliva utilizing ELISA technique. The mean of total scores for mouthbreathers group was higher and statistically significant when compared with control and treated groups. The number of yeasts was also higher in mouthbreathing syndrome patients. The level of IgA and IgM against *Streptococcus mutans* and IgA and IgM against *Candida* was smaller in the mouthbreathers. The results indicate that preventive measures for dental caries and fungic infections should be taken in mouthbreathing syndrome patients.

Key words: mouthbreathing; dental caries activity tests; *Candida*; immunoglobulins; *Streptococcus mutans*.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALALUUSUA, S. Salivary counts of mutans streptococci and lactobacilli and past caries experience in caries prediction. *Caries Res.*, v.27, suppl. 1, p.68-71, 1993.
- 2 ALALUUSUA, S. et al. Slide-scoring method for estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. *Scand. J. Dent. Res.*, v.92, p.127-33, 1984.
- 3 ANDERSON, M.H., BALES, D.J., OMNELL, K. Modern management of dental caries: the cutting edge is not the dental bur. *J. Am.Dent.Assoc.*, v.124, p. 37-44, 1993.
- 4 ARAGÃO, W. Respirador bucal (RB). *Odontol. Mod.*, v.13, p.39-41, 1986.
- 5 ARENDORF, T.M., WALKER, D.M. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch. Oral Biol.*, v.25, p.1-10, 1980.

- 6 BERDICEVSKY, I. et al. Oral candida in children. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.57, p.37-40, 1984.
- 7 BOLTON, R.W., HLAVA, G.L. Evaluation of salivary IgA antibodies to cariogenic microorganisms in children: correlation with dental caries activity. *J. Dent. Res.*, v.61, p.1225-8, 1982.
- 8 BOWEN, W. H. Interpretation and use of microbiological findings in dental caries. *Oral Microbiol Immunol.*, v.1, p.82-4, 1986.
- 9 BRATHALL, C., CARLSSON, J. Estado atual dos testes de atividade de cárie. In: THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O. *Tratado de cariologia*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1988. p.239-55.
- 10 BROWN, L.R. et al. Effect of radiation-induced xerostomia on human oral microflora. *J. Dent. Res.*, v.54, p.740-50, 1975.
- 11 BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy and prophylaxis of yeast infection. *Acta Odontol. Scand.* v.48, p.61-9, 1990.

- 12 BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Histopathology, immunology and serology of oral yeast infection. *Acta Odontol. Scand.*, v.48, p.37-43, 1990.
- 13 BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Immune response to *C. albicans* in monkeys with experimental candidiasis in the palate. *Scand. J. Dent. Res.*, v. 81, p.360-71, 1973.
- 14 BURFORD-MASON, A.P., WEBER, J.C.P., WILLOUGHBY, J.M.T. Oral carriage of *Candida albicans*, ABO blood group and secretor status in health subjects. *J. Med. Vet. Mycol.*, v.26, p.49-53, 1988.
- 15 BUTLER, J.E. et al. Humoral immunity in root caries in an elderly population, 1. *Oral Microbiol Immunol.*, v.5, p.98-107, 1990.
- 16 CAMLING, E., GAHNBERG, L., KRASSE, B. The relationship between IgA antibodies to *Streptococcus mutans* antigens in human saliva and breast milk and the numbers of indigenous oral *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.*, v.32, p.21-5, 1987.
- 17 CAMLING, E., KÖHLER, B. Infection with the bacterium *Streptococcus mutans* and salivary IgA antibodies in mothers and their children. *Arch. Oral Biol.*, v.32, p.817-23, 1987.

- 18 CHALLACOMBE S.J. Immunology of oral candidosis. In: SAMARANAYAKE, L.P., MACFARLANE, T.W. *Oral candidosis*. Cambridge: Wright, 1990. p.104-23.
- 19 COOGAN, M.M., SWEET, S.P., CHALLACOMBE, S.J. Immunoglobulin A (IgA), IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub> antibodies to *Candida albicans* in whole and parotid saliva in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Infect. Immun.*, v.62,p. 892-6, 1994.
- 20 CRALL, J.J., EDELSTEIN, B., TINANOFF, N. Relationship of microbiological, social and environmental variables to caries status in young children. *Pediatr. Dent.*, v.12, p. 233-6, 1990.
- 21 CROSSNER, C. G. Salivary lactobacillus counts in the prediction of caries activity. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, v.9, p.182-90, 1981.
- 22 EMILSON, C-G., KRASSE, B. Support for and implications of the specific plaque hypotesis. *Scand. J. Dent. Res.*, v.93, p.96-104, 1985.

- 23 EMILSON, C-G. et al. The influence of saliva on infection of the human mouth by mutans streptococci. *Arch. Oral Biol.*, v.34, p.335-400, 1989.
- 24 EPSTEIN, J.B. et al. Effects of specific antibodies in the interaction between the fungus *Candida albicans* and human oral mucosa. *Arch. Oral Biol.*, v.27, p.469-74, 1982.
- 25 ERICSSON, Y. Clinical investigation on the salivary buffering action. *Acta Odontol.Scand.*, v.17, p.131-65, 1959.
- 26 ESLAMI, A., SODEGHI, E.M. Mouthbreathers gingivitis: a clinicopathologic review. *Compend. Contin. Educ. Dent.*, v.8, p.20-4, 1975.
- 27 FABRIS, V., FIORENTINI, S., TANI, G. Modificazioni dell'indice di predisposizione alla carie secondo Snyder nei respiratori oralli. *Arcipped. S. Anna Ferrara*, v.21, p.201-5, 1968.
- 28 FÉDÉRATION DENTAIRE INTERNATIONALE. Review of methods of identification of high caries risk groups and individuals. *Int. Dent. J.*, v.38, p.177-89, 1988.

- 29 FETTER, A. et al. Assymptomatic oral *Candida albicans* carriage in HIV- infection: frequency and predisposing factors. *J. Oral Pathol. Med.*, v.22, p.57-9, 1993.
- 30 FILLER, S.J. et al. Effect of immune bovine milk of *Streptococcus mutans* in human dental plaque. *Arch. Oral Biol.*, v. 36,p. 41- 7, 1991.
- 31 FIORENTINI, S. Modificazioni dell'indice di predisposizione alla carie in corso di terapia ortognatodontica. *Arcipped. S. Anna Ferrara*, v.22, p.985-8, 1969.
- 32 FORSBERG, C.-M., TEDESTAM, G. Etiological and predisposing factors related to traumatic injuries to permanent teeth. *Swed. Dent. J.*, v.17, p.183-90, 1993.
- 33 FUGA, J.C. Etiologia das mordidas abertas. São José dos Campos, 1990. 66p. (Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Ortodontia), Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP.
- 34 GERMAINE, G. R. Infant infection with *Streptococcus mutans*: source and prevention. *North. Dent.*, v.63, p.18-20, 1984.

- 35 GOLD, O.G., JORDAN, H.V., VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.*, v.18, p.1357-64, 1973.
- 36 GOMEZ, F.J., GOMEZ, A.M., DEEPE JR., G.S. An 80-kilodalton antigen from *Histoplasma capsulatum* that has homology to heat shock protein 70 induces cell-mediated immune responses and protection in mice. *Infect. Immun.*, v.60, p.2565-71, 1992.
- 37 GREGORY, R.L. et. al. Function of anti-*Streptococcus mutans* antibodies: inhibition of virulence factors and enzyme neutralization. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 5, p.181-8, 1990.
- 38 HAMADA, S., SLADE, N. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, v.44, p.331-84, 1980.
- 39 HEIMDAHL, A., NORD, C.E. Oral yeast infections in immunocompromised and seriously diseased patients. *Acta Odontol. Scand.*, v.48, p.77-84, 1990.
- 40 HOLMSTRUP, P., AXÉLL, T. Classification and clinical manifestation of oral yeast infection. *Acta Odontol. Scand.*, v.48, p.57-9, 1990.

- 41 IACOPINO, A.M., WATHEN, W.F. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. *J. Am. Dent. Assoc.*, v.123, p.46-51, 1992.
- 42 JACOBSON, L., LINDER-ARONSON, S. Crowding and gingivitis: a comparison between mouthbreathers and nosebreathers. *Scand. J. Dent. Res.*, v.80, p.500-4, 1972.
- 43 JEGANATHAN, S., CHAN, Y.C. Immunodiagnosis in oral candidiasis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.74, p.451-4, 1992.
- 44 JONES, J.M. Humoral immune response to *Candida albicans*. *Immunol. Ser.*, v.47, p.375-400, 1989.
- 45 JORDAN, H.V. Cultural methods for the identification and quantification of *Streptococcus mutans* and lactobacilli in oral samples. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.1, p. 23-7, 1986.
- 46 JORGE, A. O. C. *Efeitos da sialoadenectomia na presença de Candida albicans e candidose na cavidade bucal de ratos*. Piracicaba, 1991. 235p. Tese (Doutorado em Biologia e Patologia Buco-Dental) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas.

- 47 JORGE, A. O. C. *Influência do uso de aparelhos ortodônticos sobre a presença de Candida albicans na cavidade bucal*. Taubaté, 1986. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Departamento de Odontologia, Universidade de Taubaté.
- 48 JORGE, A.O.C. Oral candidiasis established in the sialoadenectomised rat. *J. Oral Pathol. Med.*, v.22, p.54-6, 1993.
- 49 JORGE, A.O.C. et al. Influência do uso de aparelhos ortodônticos sobre a presença de *Candida albicans* na cavidade bucal. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.*, v.41, p.308-10, 1987.
- 50 KENNEDY, A.E. et al. Antibodies to cariogenic streptococci in humans. *Arch. Oral Biol.*, v.13, p.1275-8, 1968.
- 51 KENT, R. et al. Humoral IgG antibodies to oral microbiota in a population at risk for root-surface caries. *J. Dent. Res.*, v.71, p.1339-407, 1992.
- 52 KEYES, P.H. Present and future measures for dental caries control. *J. Am. Dent. Assoc.*, v.79, p.1395-404, 1969.

- 53 KIMMEL, L., TINANOFF, N. A modified mitis salivarius medium or caries diagnostic test. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 6, p.275-9, 1991.
- 54 KLOCK, B, KRASSE, B. A comparison between different methods for prediction of caries activity. *Scand. J. Dent. Res.*, v.87, p.129-39, 1979.
- 55 KLOCK, B., KRASSE, B. Effect of caries-preventive measures in children with high numbers of *S.mutans* and *Lactobacilli*. *Scand. J. Dent. Res.*, v.86, p.221-30, 1978.
- 56 KNIGHT, L., FLETCHER, J. Growth of *Candida albicans* in saliva: stimulation of glucose associated with antibiotics, corticosteroids and diabetes mellitus, apud: SAMARANAYAKE, L.,MACFARLANE, T.W. *Oral candidosis*. Cambridge:Wright, 1990.
- 57 KOCH, G. Importance of early determination of caries risk. *Int. Dent. J.*, v.38, p.203-10, 1988.
- 58 KOGA, C.Y. et al. Presença de *Candida albicans* e anticorpos anti-*Candida* na saliva de crianças normais e respiradoras bucais. *Rev. Bras. Odontol.*, v.50, n.6, p.8-11, 1993.

- 59 KÖHLER, B., ANDRÉEN, I., JONSSON, B. The earlier colonization by *mutans streptococci*: the higher the caries prevalence at 4 years of age. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.3, p.14-7, 1988.
- 60 KÖHLER, B., ANDRÉEN, I., JONSSON, B. The effect of caries-preventive measures in mothers on dental caries and the oral presence of the bacteria *Streptococcus mutans* and lactobacilli in their children. *Archs. Oral Biol.*, v.29, p. 879-83, 1984.
- 61 KÖHLER, B., BJARNASON, S. Mutans streptococci, lactobacilli and caries prevalence in 11- and 12- year-old Icelandic children. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, v.15, p.332-5, 1987.
- 62 KÖHLER, B., BRATHALL, D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. *J. Clin. Microbiol.*, v.9, p.584-8, 1979.
- 63 KRASSE, B. Biological factors as indicators of future caries. *Int. Dent. J.*, v.38, p.219-25, 1988.
- 64 KRASSE, B. Interpretation and use of microbiologic findings in dental caries. *Oral. Microbiol. Immunol.*, v.1, p.85-6, 1986.

- 65 KRASSE, B. *Risco de cárie: um guia prático para avaliação e controle*. São Paulo: Quintessence, 1986. 113p.
- 66 KUDO, A.M. et al. *Fisioterapia, fonoaudiologia e terapia ocupacional em Pediatria*. São Paulo: Sarvier, 1990. p.116-31.
- 67 LAY, K.M., RUSSEL, C. *Candida species and yeasts in mouth of infants from special care of maternity hospital*. *Archs. Dis. Child.*, v.52, p.794-804, 1977.
- 68 LEHNER, T. et al. Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys. *Infect. Immun.*, v. 34, p.407-15, 1981.
- 69 LEHNER, T. et al. Passive immunization with serum and immunoglobulins against dental caries in rhesus monkeys. *Lancet*, v.i, p.693-4, 1978.
- 70 LIMME, M. Etiologies non-obstructives de la respiration buccale. *Acta Otorhinolaryngology Belg.*, v.47, p.141-4, 1993.
- 71 LIMME, M. Consequénces orthognatiques et orthodontiques de la respiration buccale. *Acta Otorhinolaryngology Belg.*, v.47, p. 145-55, 1993.

- 72 LOESCHE, W.J. Cárie dental: uma infecção tratável. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1993.p.309-43.
- 73 LOESCHE, W.J. The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.1, p.65-70, 1986.
- 74 MANDEL, I.D. The functions of saliva. *J. Dent. Res.*, v. 66, sp. iss., p. 623-7, 1987.
- 75 MARCHESAN, I. Q. *Motricidade oral*. São Paulo: Pancast, p.34-67, 1993.p.34-67.
- 76 MARSH, P., MARTIN, M. *Oral microbiology*. 3. ed., London: Chapman & Hall, Londres, 1992.
- 77 MCGHEE, J.R., MICHALEK, S.M. Immunobiology of dental caries: microbial aspects and local immunity. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 35, p.595-638, 1981.
- 78 MESTECKY, J. et al. Selective induction of an immune response in human external secretions by ingestion of bacterial antigen. *J. Clin. Invest.*, v.61, p.731-7, 1978.

- 79 MOYERS, R. *Ortodontia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979.  
p. 223-91.
- 80 NEWBRUN, E. Preventing dental caries: breaking the chain of  
transmission. *J. Am. Dent. Assoc.*, v.123, p.55-9, 1992.
- 81 NOVAES, M.S.P., VIGORITO, J.W. Respiração bucal: aspectos  
gerais e principais metodologias empregadas para avaliação.  
*Ortodontia*, v.26, p.43-52, 1993.
- 82 OKSALA, E. Factors predisposing to oral yeast infections. *Acta  
Odontol. Scand.*, v.48, p.71-4, 1990.
- 83 OLSEN, I. Chemotaxonomy of yeasts. *Acta Odontol. Scand.*, v.48,  
p.19-25, 1990.
- 84 OLSEN, I. Oral adesion of yeasts. *Acta Odontol. Scand.*, v.48, p.45-  
53, 1990.
- 85 OLSEN, I., STENDERUP, A. Clinical mycologic diagnosis of oral  
yeast infections. *Acta Odontol. Scand.*, v.48, p.11-18, 1990.

- 86 OLSSON, J., SVANBERG, M. Oral implantation in man of *Sreptococcus mutans* in relation to salivary IgA activity. *Scand. J. Dent. Res.*, v. 99, p.489- 97, 1991.
- 87 ORSTAVIK,D., BRANDZAEG, P. Secretion of parotid IgA in relation to gingival inflammation and dental caries experience in man. *Arch. Oral Biol.*, v. 20, n.11, p.701-4, 1975.
- 88 PIENIHÄKKINEN, K. Caries prediction through combined use of incipient caries lesions, salivary buffering capacity, lactobacilli and yeasts counts in Finland. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, v.15, p.325-8, 1987.
- 89 PIENIHÄKKINEN, K. Salivary lactobacilli and yeasts in relation to caries increment. *Acta Odontol. Scand.*, v.46, p.57-62, 1988.
- 90 POETSCH, H. Hábitos orais. *Rev. Bras. Odontol.* , v.25, p.72-7, 1968.
- 91 POLONELLI, L. et al. Diagnostic potential of IgA coated *Candida* cells in mucous membrane candidiasis. *Mycopathologia*, v.116, p.105-12, 1991.

- 92 RIAR, D.S., NANDA, T.S., KAMLESH Mouthbreathing and gingival health. *J. Ind. Dent Assoc.*, v.42, p.13-6, 1970.
- 93 RIVIERE, G.R., WAGONER, M.A., FREEMAN, I.L. Chronic peroral immunization of conventional laboratory rats with *mutans streptococci* leads to stable acquires suppression of salivary antibodies. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.7,p. 137-41, 1992.
- 94 RODRIGUES, F.E. 1922. In: BURNETT, W.G., SCHERP, H.W., SHUSTER, G.S. *Microbiologia oral e doenças infecciosas*. 4 ed., Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, p. 302, 1978.
- 95 ROGOSA, M. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. *J. Dent. Res.*, v.30, p.682, 1951.
- 96 ROITT, I.M., LEHNER, T. *Immunology of oral diseases*. 2. ed. Oxford: Blackwell, 1983. 442p.
- 97 RUSSELL, C., LAY, K.M. Natural history of *Candida* species and yeasts in the oral cavities of infants. *Arch. Oral Biol.*, v.18, p.957-62, 1973.

- 98 RUSSELL, J.I. et al. Prediction of caries increment in Scottish adolescents. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, v. 19, p.74-7, 1991.
- 99 SAMARANAYAKE, L.P., HUGHES, A., MACFARLANE T.W. The proteolytic potential of *Candida albicans* in human saliva supplemented with gucose. *J. Med. Microbiol.*, v.17, p.13-22, 1984.
- 100 SAMARANAYAKE, L.P., MACFARLANE, T.W. *Oral candidosis*. Cambridge: Wright, 1990. 265p.
- 101 SAMARANAYAKE, L. P. et al. Growth and acid production of *Candida* species in human saliva supplemented with glucose. *J. Oral Pathol.*, v.15, p.252-4, 1986.
- 102 SAMARANAYAKE, Y.H. et al. The in vitro proteolytic and saccharolytic activity of *Candida* species cultured in human saliva. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.9, p.229-35, 1994.
- 103 SANDVEN, P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. *Acta Odontol Scand.*,v.48, p.27-36, 1990.

- 104 SCHENK, K. et al. Levels of salivary IgA antibodies reactive with bacteria from dental plaque are associated with susceptibility to experimental gingivitis. *J. Clin. Periodontol.*, v.20, p.411-7, 1993.
- 105 SCHLAGENHAUF, V., ROSENDAHL, R. Clinical and microbiological caries-risk parameters at different stages of dental development. *J. Pedod.*, v.14, p.141-3, 1990.
- 106 SEGOVIA, M.L. *Interrelaciones entre la odontoestomatología y la fonaudiología: la deglutiòn atípica*. Buenos Aires: Panamericana, 1977. p.111-8.
- 107 SIMS, W. The interpretation and use of Snyder tests and lactobacillus counts. *J. Am. Dent. Assoc.*, n.80, p.1315-9, 1970.
- 108 SMITH, D.J. et al. Effect of antibody in gingival crevicular fluid on early colonization of exposed root surfaces by mutans streptococci. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.9, p.65-9, 1994.
- 109 SNYDER, M.L. Laboratory methods in the clinical evaluation of caries activity. *J. Am. Dent. Assoc.*, v.42, p.400-13, 1951.

- 110 SNYDER, M.L. A simple colorimetric method for estimation of relative numbers of lactobacilli in the saliva. *J. Dent. Res.*, v.19, p. 349-55, 1940.
- 111 SOCRANSKY, S. Caries-susceptibility tests. *Ann NY Acad. Sci.*, v.153, p.137-46, 1968. apud: VAN HOUTE, J. Microbiological predictors of caries risk. *Adv. Dent. Res.*, v.7, p. 87-96, 1993.
- 112 STECKSÉN-BLICKS, C. Salivary counts of lactobacilli and *Streptococcus mutans* in caries prediction. *Scand. J. Dent. Res.*, v.93, p.204-12, 1985.
- 113 STENDERUP, A. Oral mycology. *Acta Odontol. Scand.*, v.48, p.3-10, 1990.
- 114 TANZER, J.M., CLIVE, J. Quantitative considerations in microbiological evaluations for caries: risk for type II errors resulting from use of MSB agar. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.1, p.28-30, 1986.
- 115 TANZER, J.M. et al. Glucose-sucrose-potassium tellurite-bacitracin agar, an alternative to mitis salivarius-bacitracin agar for enumeration of *Streptococcus mutans*. *J. Clin Microbiol.*, v.20, p.653-9, 1984.

- 116 TAPPUNI, A.R., CHALLACOMBE, S.J. A comparison of salivary immunoglobulin A (IgA) and IgA subclass concentrations in pre-dentate and dentate children and adults. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.9, p. 142-5, 1994.
- 117 TENOVUO, J. et al. Antimicrobial factors of saliva in relation to dental caries and salivary levels of mutans streptococci. *J. Biol. Buccale.*, v.20,p.85-90, 1992.
- 118 THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O. *Tratado de Cariologia.*, Rio de Janeiro, Cultura Médica, 1988.
- 119 TOGELIUS, J., BRALTTTHALL, D. Frequency of the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva of selected human populations. *Arch. Oral Biol.*, v.27, p.113-6, 1982.
- 120 TORRES, S.A. et al. Estreptococos do grupo mutans: avaliação do ágar SB<sub>20</sub> e MSB na determinação de UFC na saliva e na placa dental de adolescentes. *Rev. Bras. Odontol.*, v.50,p.18-21, 1993.

- 121 TUKIA-KULMALA, H. , TENOVUO, J. Intra and inter-individual variations in salivary flow rate, buffer effect, lactobacilli and mutans streptococci among 11 and 12 year-old schoolchildren. *Acta Odontol. Scand*, v.51, p.31-7, 1993.
- 122 VAN HOUTE, J. Lactobacilli in human dental plaque and saliva. *J. Dent. Res.*, v.60, p.2-5, 1981.
- 123 VAN HOUTE, J. Microbiological predictors of caries risk. *Adv. Dent. Res.*, v.7, p.87-96, 1993.
- 124 VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J. Dent. Res.*, v.73, p.672-81, 1994.
- 125 VIEIRA, S. *Introdução à bioestatística*. 2 ed. Rio de Janeiro, Campus, 1983.
- 126 WESTERGREN, G., KRASSE, B. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. *J. Clin. Microbiol.*, v.7, p.82-3, 1978.

- 127 WEYNE, S. Cariologia. In: BARATIERI, L.M. et al. *Dentística: procedimentos preventivos e restauradores*. Rio de Janeiro: Quintessence, 1992. p.1-42.
- 128 WEYNE, S. Curso de atualização e educação continuada em Odontologia preventiva (cariologia). *Rev. Bras. Odontol.*, v.43, p.36-64, 1986.
- 129 WINDERSTRÖM, L., BRATHALL, D., KAMBERG, K. Immunoglobulin A antibody to mutans Streptococci in parotid, submandibular and whole saliva. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.7, p. 326-31, 1992.
- 130 WRAY, D., FELIX, D.H., CUMMING, C.G. Alteration of humoral responses to *Candida* in HIV infection. *Br. Dent. J.*, v.168, p.326-9, 1990.
- 131 ZICKERT, I., EMILSON, C.G., KRASSE, B. *Streptococcus mutans*, lactobacilli and dental health in 13-14 year-old Swedish children. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, v.10, p.77-81, 1982.