

CLÁUDIA PEREZ TRINDADE

**EFEITO DO USO DE GOMA DE MASCAR CONTENDO XILITOL
SOBRE OS NÍVEIS SALIVARES DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO
MUTANS, SOBRE OS GENÓTIPOS DE *S. MUTANS* E SOBRE A
PRESENÇA DE AMOSTRAS XILITOL-TOLERANTES NA SALIVA**

São Paulo

2005

Cláudia Perez Trindade

Efeito do uso de goma de mascar contendo xilitol sobre os níveis salivares de Estreptococos do grupo mutans, sobre os genótipos de *S. mutans* e sobre a presença de amostras xilitol-tolerantes na saliva

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer

São Paulo

2005

FOLHA DE APROVAÇÃO

Trindade CP. Efeito do uso de goma de mascar contendo xilitol sobre os níveis salivares de Estreptococos do grupo mutans, sobre os genótipos de *S. mutans* e sobre a presença de amostras xilitol-tolerantes na saliva [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

São Paulo, / /2005.

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A todos aqueles que um dia foram meus alunos e aos que ainda são, por darem sentido a todo tempo que vivi dedicando-me ao ensino e docência. Foi graças à vocês, pela confiança, carinho e apoio que me deram, que obtive motivação durante todo período de elaboração deste trabalho.

A todos aqueles que fazem da docência e da pesquisa um caminho sem volta de dedicação, trabalho, esforço e perseverança, muitas vezes com sacrifícios de suas vidas pessoais, passando por dificuldades e adversidades em muitos aspectos, mas sempre dando o melhor de si aos seus aprendizes, com dignidade, competência, amor e respeito, dedico este trabalho. Em especial a três grandes mulheres, amigas e professoras, exemplos reais de tudo que foi dito anteriormente, às quais devo meu sincero e profundo agradecimento, Professora Dra. Maria Salete Nahás Pires Corrêa, Professora Dra. Célia Regina Martins Delgado e Professora Dra. Márcia Pinto Alves Mayer.

À memória da minha amada avó Adelina Perez.

À memória de um querido amigo, Prof. Dr. Ricardo Simão Mathias, por tudo que me ensinou em todos os momentos de agradável convívio.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer, por dar-me a oportunidade de tamanho aprendizado em seu laboratório, pela paciência, disponibilidade e carinho dedicado a este trabalho, pela competência em conduzir a orientação e realização deste estudo, pela amizade, pelo companheirismo, pelos conselhos, por ser tão exemplar e admirável, por tudo!!!! Muito obrigada!

Ao meu querido Professor Dr. Antônio Carlos Guedes-Pinto, que me conduziu até aqui com sua mão amiga e firme, grande mestre, amigo e companheiro, que tantas vezes me ajudou a levantar dos tombos! Obrigada pelo respeito, carinho e compreensão com que sempre me tratou, mesmo nos (poucos) momentos de discórdia que tivemos. O senhor sabe de todo carinho que lhe tenho e sempre morará em meu coração.

Aos Professores da Disciplina de Odontopediatria, da minha amada casa e escola, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo: Profa. Dra. Célia Regina Martins Delgado Rodrigues, Profa. Dra. Maria Salete Nahás Pires Corrêa, Profa. Dra. Ana Lídia Ciamponi Martins, Profa. Dra. Márcia Turolla Wanderley, Profa. Dra. Ana Estela Haddad, Prof. Dr. Marcelo José Strazzeri Bönecker, Prof. Dr. José Carlos Petorossi Imparato, pela amizade e convivência científica compartilhada.

Aos QUERIDOS amigos que fiz no Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciência Biomédicas II, sem os quais não teria conseguido: Cláudia Ota, Francisco César Barbosa, Alessandra Carvalho, Josely Umeda, Dione Kawamoto, Ellen Sayuri, Amanda Prestia, Tânia Schalch, Josely Umeda, Francisco Pina, Daniel Anzai, Adriana Ribeiro, Thaís Thomé, Silvia Teixeira, Irineu Pedron, Vera Fantinatto, e, especialmente, Fábio Luis Lembo, Ana Carla Robatto e Priscila Larcher Longo (meus irmãos na vida), minha eterna gratidão pelo carinho, disposição, colaboração, apoio científico, técnico e emocional que me dedicaram. Vocês permanecerão para sempre na minha lembrança e em meu coração!

Aos funcionários do Departamento de Ortodontia e Odontopediatria Viviane, Edna, Marinalva, Clemência, Izilda, Marize e, especialmente Conceição (curtindo agora sua aposentadoria), Julio e Fátima, que me apoiaram sempre!

A todos os funcionários da FOU SP, da diretoria à biblioteca, passando por todos os departamentos até o bar do Dentinho's, meus agradecimentos pelo apoio, colaboração, paciência e amizade nestes 20 anos de convívio carinhoso!

À Cleide Rosana Duarte Prisco pela realização da análise estatística.

À bibliotecária Glauci Elaine Damasio Fidelis pela formatação do texto e normalização das referências bibliográficas.

Ao funcionário do ICB II João Paulo pelo apoio, ensinamentos, coleguismo e colaboração efetiva neste trabalho.

Às minhas grandes e maravilhosas amigas Tânia Corrêa, Eliete Domingues Almeida e Eliana Hitomi Kawahara, por tornarem minha vida mais doce nos momentos mais amargos. Sou muito feliz por tê-las sempre por perto.

Aos colegas e professores companheiros de trabalho da Universidade Mogi das Cruzes (UMC) Elaine Marcílio dos Santos, Sandra Kalil Bussadori, Heloisa Helena Cardoso Guedes, Eliete Almeida e Marcos Augusto do Rego (inesquecível) pelos momentos alegres, gratificantes e agradáveis no trabalho.

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, pela amizade e companheirismo, em especial Henrique Ruschel e Symonne Parizotto, e, principalmente, às amigas Alessandra Nassif e Isa Gontijo, elas sabem o porquê!

Aos meus pais Rui Trindade e Neusa Peres Trindade, meus irmãos Osvaldo, Andréa e Ronaldo, meus familiares, em especial minhas tias Djanira Trindade e Ana Lúcia Trindade, por fazerem de mim uma pessoa feliz, contagiando minha vida com bons exemplos de força, garra, persistência, superação, retidão de conduta e caráter e, especialmente, de MUITA ALEGRIA!

Aos voluntários que, com todo desprendimento e disponibilidade, se dispuseram a participar com seriedade e dedicação deste estudo. Sem vocês este trabalho não seria possível. Mais uma vez: muito obrigada!

Aos amigos da odontologia Abdo-Pinheiro: Dra. Miriam Abdo Pinheiro e Dr. João Francisco de Camargo Pinheiro Junior, Dra. Marina Coelho, Rosana Reis, Lúcia, Paula, Edilena e Jane pela paciência, incentivo, compreensão e apoio durante este período.

À Perfetti Van Melle do Brasil pelo fornecimento das gomas de mascar e pelas informações sobre o produto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo oferecida durante parte do curso.

“Lecionar é também ouvir os apelos que ecoam na alma do educando. Mais do que avaliar as provas e dar notas, o importante é ensinar com amor, mostrando que sempre é possível fazer a diferença”.

Autor desconhecido

“Spread your wings and get higher and higher... straight up we´ll climb; so, baby dry your eyes, save all the tears you cry. Oh! That´s what dreams are made of!!!”

(“Dreams” - Van Halen)

Trindade CP. Efeito do uso de goma de mascar contendo xilitol sobre os níveis salivares de Estreptococos do grupo mutans, sobre os genótipos de *S. mutans* e sobre a presença de amostras xilitol-tolerantes na saliva [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito do uso de goma de mascar contendo 15% de xilitol, por 30 dias, em 12 indivíduos com altos níveis salivares ($= 10^5$ u.f.c./ml de saliva) de Estreptococos do grupo mutans (SM) sobre os níveis salivares de SM, os genótipos de *S. mutans* e a ocorrência de amostras xilitol-tolerantes (X^R) na saliva. Os voluntários foram instruídos a mascarem a goma por 5 minutos, 5 vezes ao dia, durante 30 dias, sem realizarem nenhuma alteração nos hábitos de higiene ou dieta. Amostras de saliva foram coletadas no início do experimento (antes do consumo da goma de mascar), 30 dias após a utilização da goma de mascar e 30 dias após a interrupção do uso da goma. Dois voluntários foram excluídos da última coleta devido ao uso de antibióticos. Os resultados mostraram que ocorreu redução acentuada nos níveis salivares de SM. A concentração média de SM no exame inicial foi de $9,8 \times 10^5 \pm 2,61 \times 10^5$ UFC/ml de saliva, enquanto este valor foi de $2,17 \times 10^5 \pm 1,94 \times 10^5$ após o consumo da goma, sendo a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Porém este efeito não foi duradouro, não apresentando diferença estatística 30 dias após a interrupção do consumo ($3,5 \times 10^5 \pm 2,71 \times 10^5$), em relação aos valores iniciais. Foram identificados 17 genótipos distintos de *S. mutans* nas amostras salivares de 10 voluntários, que completaram as 3 etapas do estudo, pela técnica de RAPD-PCR, com o iniciador OPA-2. O ensaio de tolerância

de *S. mutans* ao xilitol *in vitro*, em meio BHI e BHI /xilitol 1%, permitiu a identificação de 12 amostras X^R entre 124 amostras estudadas, representantes dos 17 genótipos distintos. Amostras de *S. mutans* (X^R) foram identificadas nas 3 coletas, inclusive antes do consumo da goma. Foram identificadas amostras X^R e X^S com o mesmo genótipo por RAPD-PCR. A prevalência de amostras X^R não apresentou relação direta com o uso de xilitol ou com os tipos genotípicos. Baseados nas condições do presente estudo, os resultados sugerem que o uso regular de gomas de mascar contendo 15 % de xilitol por 30 dias contribui para a redução dos níveis salivares de SM durante o período de consumo, porém esta redução não persiste após a interrupção do uso. Além disso, foi observado que o uso de xilitol não foi fator determinante na seleção *in vivo* de determinado genótipo X^R .

Palavras-Chave: xilitol; cárie dentária; *S.mutans*; goma de mascar.

Trindade CP. Effect of xylitol-containing chewing gum consumption on salivary mutans streptococci levels, on genotypes of *S.mutans* and on the presence of xylitol-resistant strains in saliva [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of xylitol (15%) containing chewing gum, for 30 days, in 12 subjects with high mutans Streptococci (MS) salivary levels ($= 10^5$ c.f.u./ml) on Mutans streptococci (MS) salivary levels, on genotypes and detection of xylitol tolerant (X^R) strains of *S. mutans*. Volunteers were asked to chew one lozange, for 5 minutes, five times per day, for 30 days with no change in their habitual diet or oral hygiene. Saliva samples were collected at baseline, 30 days after gum usage and 30 days after the interruption of the consumption. Two subjects were excluded from the last examination due to antibiotic use. The results showed a marked reduction in MS salivary levels. The average levels of MS in saliva in baseline was $9.8 \times 10^5 \pm 2.61 \times 10^5$ c.f.u./ml saliva and decreased to $2.17 \times 10^5 \pm 1.94 \times 10^5$ after 30 days of consumption. This difference was statistically significant ($p < 0.05$). However this effect was not long lasting, and 30 days after the interruption of consumption ($3.5 \times 10^5 \pm 2.71 \times 10^5$) there was no statistically difference in relation to baseline data. Seventeen different genotypes were identified in MS salivary samples of 10 volunteers that completed the 3 sampling procedures, by RAPD-PCR using OPA-2 primer. The assay of xylitol tolerance of *S. mutans in vitro*, in BHI and BHI/1% xylitol allowed the identification of 12 X^R isolates, among 124 tested strains representing all detected genotypes. X^R strains were detected in all sampling steps,

including at baseline, before chewing gum consumption. There were X^R and X^S isolates with the same genotypes by RAPD-PCR. The prevalence of X^R strains did not show direct relation to consumption of xylitol neither to genotypes. Based on the conditions of the present study, the data suggested that the regular use of a chewing gum containing 15% xylitol for 30 days contributed to decrease MS salivary levels, however this decrease did not persist after the interruption of the consumption. In addition, the usage of xilitol was not a determinant to the emergence of a specific X^R genotype *in vivo*.

Keywords: Xylitol – Dental caries – mutans streptococci - chewing gum

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATP	molécula de energia de Adenosina Trifosfato
SM	Streptococos do grupo mutans
u.f.c./ml	Unidades formadoras de colônias por mililitro de saliva
PCR	Reação de polimerase em cadeia
RAPD-PCR	Reação de PCR utilizando iniciadores arbitrários
AP-PCR	Reação de PCR utilizando iniciadores arbitrários
PFGE	Reação de genotipagem utilizando Pulsed field gel electrophoresis
BHI	Meio de cultura “Brain Heart Infusion”, contendo infusão de células de cérebro e coração.
FDA	Food and Drug Administration
nm	nanômetros

LISTA DE SÍMBOLOS

°C graus Celsius

μl microlítro

CO₂ gás carbônico

% por cento

Abs_{450 nm} medida de densidade óptica para turvação de soluções utilizando-se
filtro de absorbância de 450 nanômetros

X^R *S. mutans* xilitol-tolerante

X^S *S. mutans* xilitol-sensível

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Efeitos preventivos do xilitol e sua ação sobre <i>Streptococcus mutans</i>	21
2.2 <i>Streptococcus mutans</i> e a tolerância ao xilitol	36
3 PROPOSIÇÃO	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
5 RESULTADOS	57
6 DISCUSSÃO	82
7 CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS	100
ANEXOS	108

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença infecciosa dieta-dependente atribuída primariamente à presença de bactérias orais. A sacarose, um dissacarídeo constituído por uma molécula de glicose e outra de frutose, é considerada o principal componente da dieta cariogênica. Sua alta frequência de ingestão leva à seleção de espécies acidúricas na placa bacteriana, principalmente *Streptococcus mutans* (SM). *S.mutans* é particularmente virulento entre as bactérias orais por sua capacidade em converter carboidratos fermentáveis a ácidos, principalmente ácido láctico, que, em contato com as superfícies dentais favorece a dissolução do esmalte dental e início do processo carioso (LOESCH, 1986). Outros mecanismos de virulência importantes são a capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares, modificando as características físico-químicas do biofilme, promovendo a adesão microbiana, bem como síntese e estoque de polissacarídeos intracelulares, utilizados por estas células em períodos de ausência de substrato energético no ambiente; por sua aciduricidade, conseguem sobreviver no meio ácido, não sendo, portanto, afetados pelos produtos de seu próprio metabolismo (MAO; ROSEN, 1980; MOBLEY, 2003).

Um grande número de substitutos do açúcar refinado (sacarose) tem sido testado e utilizado na tentativa de prevenção da cárie dentária, sendo o xilitol reconhecido como o mais promissor entre eles (GERING et al., 1976; ISOKANGAS et al., 1991; ROGERS et al., 1991; SÖDERLING et al., 1997; KAKUTA et al., 2003).

O xilitol é um álcool-açúcar natural com 5 carbonos, considerado agente cárie-preventivo. Com poder adoçante similar ao açúcar, contendo 40% menos calorias que a sacarose, é produzido a partir de uma variedade de frutas e vegetais,

mas é extraído principalmente da Bétula e árvores especiais, cuja madeira é utilizada para fabricação de instrumentos musicais, contendo altas concentrações de xilanos, próprias dos países escandinavos. Atualmente, a produção mundial de xilitol ultrapassa 10.000 toneladas por ano e é direcionada principalmente à confecção de produtos manufaturados, na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e de higiene corporal e oral (LYNCH; MILGROM, 2003; MAGUIRE; RUGG-GUNN, 2003). Em produtos da dieta, sua adição pode substituir todo ou parte do açúcar contido em balas, doces e gomas de mascar (SINTES et al., 2002). Seu poder cariostático, ou até anticariogênico, está associado a algumas propriedades específicas deste adoçante. O xilitol não é fermentado à ácidos por praticamente nenhum dos microrganismos orais, incluindo bactérias cariogênicas como *S.mutans* e *S.sobrinus*, não provocando queda do pH do biofilme dental, evitando a desmineralização. Além disso, tem sido relatado que o uso de gomas de mascar e pastilhas contendo este poliálcool induz a diminuição da formação de biofilme dental, facilita o retorno do pH para valores próximos ao neutro, favorece o tampão salivar por alterar a composição de fosfato no meio bucal, além de induzir o aumento do fluxo salivar pelo ato da mastigação e estímulo gustativo, definindo seu efeito cariostático (KAKUTA et al., 2003; MOBLEY, 2003). A substituição total ou parcial do açúcar pelo xilitol na dieta humana resulta numa considerável redução na incidência de cárie dentária (GERING et al., 1976; BECKERS, 1998; MAKKINEN et al., 1996). Em estudos clínicos com a participação de humanos, seu consumo tem sido associado à redução significativa de cárie em crianças e adultos jovens (ROGERS et al., 1991; ISOKANGAS et al., 1991; ISOKANGAS et al., 2000).

A transmissibilidade vertical do *S.mutans* é relatada na literatura (BERKOWITZ; JORDAN, 1975; BERKOWITZ; JONES, 1985; LI; CAULFIELD, 1995;

CAULFIELD, 1997; REDMO-EMANUELSSON; LI; BRATTHALL, 1998; SÖDERLING, et al., 2000; ROBERTS et al., 2002). Alguns estudos procuram envolver o uso do xilitol na prevenção desta transmissão (HOUTE, 1981; ISOKANGAS et al.,2000; SÖDERLING et al., 2000), postergando o estabelecimento da infecção na criança com o uso de gomas de mascar contendo xilitol pela mãe, no período da janela de infectividade da criança (SODERLING et al., 2001).

O principal sistema de transporte de hexoses bem demonstrado e conhecido em *S.mutans* é o Sistema-Fosfotransferase, também conhecido como sistema-PTS. A sacarose, no meio bucal, sofre ação de enzimas salivares, sendo rapidamente dissociada em dois monossacarídeos distintos: frutose e glicose. Cada uma dessas moléculas será transportada para o interior da célula bacteriana e fosforilada na via glicolítica pelo seu sistema-PTS específico, ou seja, sistema frutose-PTS e glicose-PTS, mecanismos celulares constitutivos da bactéria. Após uma seqüência de transferências de grupamentos fosfatos, ao final da via glicolítica, a fosforilação destes monossacarídeos fornecerá energia, sob a forma de ATPs e metabólitos para a excreção, sob a forma de ácido láctico. O xilitol é transportado e fosforilado pelo sistema do metabolismo ligado à fosforilação da frutose, ou seja, o sistema frutose-PTS (TRAHAN et al.,1981; TRAHAN;MOUTON, 1987; TRAHAN; NÉRON; BAREIL, 1991).

A hipótese da não utilização do xilitol como substrato pelos microrganismos orais para a produção de ácidos, em especial pelo *S.mutans*, baseia-se no fato de que, ao entrar na célula bacteriana, o xilitol inicia o processo de fosforilação na via glicolítica formando um composto intermediário do metabolismo, o xilitol-5-fosfato, que não é metabolizado por nenhuma enzima. Assim, não leva à formação de ácidos nem de energia (ATPs) no final da cadeia de fosforilação, mas torna-se um

produto tóxico para a célula. Com o intuito de livrar-se deste metabólito, a célula bacteriana exporta de seu citoplasma o composto formado, com gasto de energia. Essa captação de xilitol para o interior da célula e posterior transporte do produto para fora gera um ciclo conhecido como “Ciclo Fútil” que esgota os recursos energéticos da célula e, em última instância, provoca o desgaste e morte celular por depleção de energia (ROGERS et al., 1991; TRAHAN, 1995; KAKUTA et al., 2003; MAGUIRE; RUGG-GUNN, 2003).

Porém, existem relatos de cepas de *S.mutans* com resistência ao xilitol. Knuuttila e Mäkinen (1975), relataram que *S.mutans* se desenvolveram em meio de cultura contendo xilitol após algumas transferências das bactérias neste meio, o que chamaram de “tolerância adaptativa”. Gauthier, Vandeboncoeur e Mayrand (1984), também verificaram que a perda da sensibilidade ao xilitol ocorria progressivamente em cepas de *S.mutans* cultivadas em laboratório na presença de xilitol. Este aparecimento natural e seletivo de uma população de *S.mutans* considerada espontaneamente resistente ao xilitol, ou “mutantes naturais”, como os autores chamaram inicialmente, fez com que surgissem os termos amostras xilitol-resistentes ou xilitol-tolerantes para designá-las. Estas amostras com resistência ao xilitol têm sido consideradas menos virulentas que as amostras selvagens por apresentarem menor poder de adesão ao biofilme, menor capacidade de produzir glucanos insolúveis e, especialmente, pela menor produção de ácidos, sendo, portanto, menos virulentas no que diz respeito ao processo da iniciação e evolução da cárie (BECKER, 1988; TRAHAN et al., 1992; SÖDERLING et al., 2001).

A hipótese para explicar a resistência das células bacterianas ao xilitol baseia-se na possível ausência ou redução na atividade do mecanismo de transporte constitutivo frutose-PTS, responsável pelo transporte da frutose e do xilitol

em *S.mutans*. Assim, essas bactérias, não transportando a frutose ou o xilitol para o interior de seu citoplasma, não acumulam o metabólito tóxico, xilitol-5-fosfato, conferindo-lhes deste modo tolerância ao poliálcool. (TRAHAN, 1981; TRAHAN; MOUTON, 1987).

A falta ou “falha” do mecanismo constitutivo da frutose-PTS pode ser desvantagem ecológica, pois, na presença de sacarose, estas cepas tornam-se menos competitivas pela sobrevivência no ambiente. Por outro lado, isto pode ser vantajoso num meio onde há oferta de xilitol, pois as cepas sensíveis seriam inibidas pelo poliálcool e as resistentes tornariam-se prevalentes, sendo naturalmente selecionadas.

Esta população de *S.mutans*, chamada tolerante, que não tem seu crescimento diminuído pelo xilitol, pode ser obtida em laboratório através de passagens progressivas das culturas bacterianas em meio contendo pequenas concentrações de xilitol (0,5 a 5%) ou através da inativação do gene que codifica o metabolismo da frutose (GAUTHIER; VANBEBONCOEUR; MAYRAND, 1984; TRAHAN; BOURGEAU; BRETON, 1996; BENCHABANE et al., 2002; TANZER, 2005). Resta ainda saber se essas populações de *S.mutans* xilitol-resistentes podem ser selecionadas *in vivo*, pelo consumo freqüente e regular do xilitol, pois, sendo menos virulentas, poderiam melhorar a qualidade da população de *S.mutans* no biofilme, sustentando o papel cárie-preventivo do xilitol.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Muitos estudos são apresentados na literatura com o objetivo de compreender os diversos mecanismos envolvidos na ocorrência, diagnóstico, desenvolvimento e tratamento da cárie.

Streptococcus mutans é um coco gram positivo que foi descrito pela primeira vez por Clarke (1924). Estudos de Gibbons et al. (1966), Krasse (1966), confirmaram que estreptococos descritos em crianças cárie-ativas eram os mesmos descritos por Clarke, chamados *S.mutans*, sendo os microrganismos mais prevalentes e associados à cárie em seres humanos (CAUFIELD, 1997)

Köhler, Andréen e Jonson (1988), mostraram que, quanto mais cedo os *S.mutans* são detectados na saliva de um indivíduo, maior será a experiência de cárie comparada aos indivíduos que foram colonizados mais tardiamente ou que nunca foram colonizados e que há forte e clara associação entre nível salivar de SM com a prevalência e experiência de cárie (ALALUUSUA; MYLLÄRNIEMI; KALLIO, 1989; BOWDEN, 1997).

Diante destes conceitos vários autores propõem a prevenção da cárie na adoção de medidas que promovam a queda do nível salivar de SM. Esta queda pode ser obtida no próprio indivíduo afetado pela doença ou no agente da transmissão vertical, normalmente considerado como sendo os pais, principalmente a mãe, de crianças no período da janela de infectividade. (BERKOWITZ; TURNER; GREEN, 1980; DAVEY; ROGERS, 1984; ZICKERT; EMILSON; KRASSE, 1982; LI; CAUFIELD, 1995; THORILD; LINDAU-JONSON; TWETMAN, 2002).

A sacarose não só aumenta o nível salivar de *Streptococcus mutans* no biofilme, como também favorece a síntese de glucanos que promovem maior adesão destes microorganismos às superfícies dentais, aumentando a formação da massa microbiana, impedindo o tamponamento dos ácidos formados no interior do biofilme ou a eliminação dos mesmos pela saliva (HOUTE, 1994; ALALUUSUA et al., 1996). Portanto a substituição da sacarose na dieta por adoçantes menos cariogênicos vem sendo sugerida por muitos autores, sendo que o xilitol é considerado o mais promissor entre os substitutos do açúcar (GEHRING et al., 1976; BECKERS, 1988; BIJELA, ZANELA, 1994; BIRKHED, 1994; HILDEBRANDT; SPARKS, 2000; LYNCH; MILGROM, 2003).

2.1 Efeitos preventivos do xilitol e sua ação sobre *Streptococcus mutans*

O xilitol é um produto natural produzido comercialmente a partir da casca de árvores especiais como a Bétula e outras madeiras contendo xilano (LYNCH; MILGROM, 2003). Também ocorre naturalmente em frutas e vegetais. Contém 40% menos calorias que a sacarose e o principal efeito colateral associado ao seu consumo é a diarreia osmótica, uma vez que ele é muito lentamente absorvido pelo trato gastro-intestinal, necessitando muita água para ser diluído. Porém, isso só ocorre com o consumo de doses de 4 a 5 vezes maiores do que aquela necessária para prevenção da cárie dental.

A produção atual de xilitol é maior que 10.000 toneladas por ano, direcionada principalmente à confecção de produtos manufaturados e indústria alimentícia, farmacêutica e de higiene oral. No Reino Unido o consumo de xilitol é cerca de uma

tonelada ao ano, principalmente em chicletes e balas, dentifrícios e medicamentos. Foi demonstrado que a mancha branca de cárie, estágio de pré-cavitação, é remineralizada com o uso de xilitol (MAGUIRE; RUGG-GUNN, 2003). Alguns termos como “não-cariogênico”, “anti-cariogênico”, “cariostático” e “anti-cáries” têm sido utilizados para descrever a ação deste adoçante. Os mecanismos específicos pelos quais o xilitol vem assumindo este papel seriam:

- ◆ O desenvolvimento de amostras *S.mutans* resistente ao xilitol que podem ser menos virulentas que as amostras selvagens xilitol-sensíveis na cavidade oral.
- O aumento de concentração de aminoácidos e amônia na saliva que neutralizam os ácidos na cavidade bucal.
- Atua como agente bacteriostático da seguinte maneira: algumas células bacterianas captam o xilitol e o convertem ao composto não metabolizável, o xilitol-5-fosfato, tóxico para a célula.
- Provoca a ocorrência de um ciclo metabólico inútil, chamado “Ciclo Fútil”, com gasto desnecessário de energia, pois a célula bacteriana captura o xilitol, fosforila-o a xilitol-5-fosfato que, não sendo metabolizado, promove o gasto da energia celular para transportá-lo para fora.

Estes fatos serão abordados com mais clareza a medida que avançarmos nesta revisão de literatura.

Mobley (2003), em uma revisão sobre dieta, afirma que alguns componentes da dieta promovem o processo de cárie, enquanto outros têm potencial protetor e atuam melhorando o processo de remineralização. Esses alimentos são referenciados como “anticariogênicos” ou “cariostáticos”, pois neutralizam os ácidos e restauram o esmalte

dental, estimulando a salivacão com efeitos benéficos. Segundo o autor, nos EUA o FDA autoriza nestes alimentos a utilização dos termos “não promove” (does not promote), “útil em não promover” (useful in not promoting) ou “reconhecido por não promover cárie dental” (expressly for not promoting dental caries) nos rótulos de alimentos que contenham um ou mais álcoois-açúcares na formulação. Os álcoois-açúcares nutritivos, incluindo o sorbitol, manitol e xilitol, contêm cerca de 40 a 75% do conteúdo calórico da sacarose e são reconhecidos como possuidores de um potencial cariogênico muito baixo. Este autor sugere que, após beber ou se alimentar, os indivíduos utilizem alimentos cariostáticos, como gomas de mascar contendo xilitol, como métodos de prevenção e proteção contra a cárie. Bijela e Zanela (1994) afirmam que o xilitol tem boa solubilidade, é inodoro e de sabor agradável. Usado em chicletes, promove o estímulo da secreção salivar e aumento da concentração de certos eletrólitos; com isto a capacidade tampão da saliva teria um efeito preventivo específico. Todos os álcoois polihídricos não são totalmente digeridos no intestino. Isto significa que parte do adoçante passa pelo corpo hidratando-se no percurso, causando diarreia osmótica, quando mais de 25 a 50 g de adoçante forem consumidos por dia. A dose recomendada é de 150 mg/Kg/dia.

O xilitol é aceito universalmente como **não-cariogênico**, mas pode também ser classificado como **cariostático**. O termo **anticariogênico** também tem sido sugerido, uma vez que promove a reversão da lesão através da remineralização das lesões incipientes. **‘Cariostático’** e **‘anticariogênico’** são afirmativas para a terapêutica, enquanto **‘não-cariogênico’** ou **‘saúdável para os dentes’** são afirmativas para o controle da saúde. Na Finlândia e Suécia é permitido o uso de logotipo especial para

identificar os produtos que contenham porcentagem de xilitol acima de 50%. (BIRKHED, 1994).

A utilização dos adoçantes em forma de gomas de mascar, ao invés de bochechos ou diretamente na dieta, é mais indicada, pois além da quantidade utilizada ser pequena, a concentração na cavidade oral em contato com o biofilme pode ser alta. As balas podem ser tão efetivas quanto gomas de mascar como veículos para a liberação do xilitol, enquanto agente protetor da cárie. Produtos alimentícios contendo xilitol estão disponíveis no mercado, mas faz-se necessário um trabalho considerável para produzir estes produtos comercialmente, tornando-os viáveis e aceitos. De acordo com os dados disponíveis, nos EUA não há veículo para a utilização do xilitol em mamadeiras ou para crianças pré-escolares e muito jovens, como alternativa para as gomas de mascar. Estes produtos podem ser utilizados seguramente por mulheres grávidas e mulheres que estão amamentando (LYNCH; MILGROM, 2003). Tanzer (1995) afirma que altos índices de fluxo salivar, resultante da alimentação ou da mastigação de gomas, por exemplo, estão associados com o rápido aumento do pH salivar (para cerca de 7,6 – 7,8) comparativamente com o pH da saliva em repouso, em índices de fluxo baixos (valores menores que 5,5 – 6,0). No entanto, se esta goma de mascar contiver sacarose, a produção ácida da placa bacteriana é imediatamente induzida e o pH entre a placa e a superfície dental abaixa rapidamente para valores próximos a 4,0. Porém, a análise da literatura não demonstrou, em nenhum estudo, que o xilitol usado em gomas de mascar induzia à formação de lesões de cáries, em altas ou baixas concentrações. Pelo contrário, ocorreu de 30 a 65% de redução da cárie entre os grupos que utilizaram gomas de mascar com altas concentrações de xilitol. A goma de mascar, para este autor, parece ser o veículo ideal para liberação de substâncias inibidoras da cárie, promovendo uma relação de alta concentração entre o

produto e as superfícies dos dentes, enquanto pequenas quantidades são engolidas. Conclui que a extensa literatura sobre o uso do xilitol reforça a assertiva que gomas de mascar, especialmente com alta concentração de xilitol, são **não-cariogênicas** e, provavelmente, inibem a cárie dentária.

A tentativa de utilização do xilitol como substituto de parte do açúcar refinado consumido na dieta humana, com a finalidade de reduzir o risco de cárie, teve como pioneiros os países escandinavos, especialmente a Finlândia. No estudo clássico de Turku, Gehring et al. (1976), verificaram, após 2 anos de uso crônico do xilitol na dieta, se ocorreria ou não adaptação ou mutação da microbiota do biofilme, capaz de degradar o xilitol a ácidos. Entre os resultados, os autores observaram que SM ocorreram de maneira significativamente menor no grupo xilitol do que nos grupos que usaram sacarose ou frutose. Os resultados também indicaram que não houve adaptação do microorganismo ao xilitol, embora esta adaptação tenha sido observada em estudos *in vitro*. Quando se usa concomitantemente xilitol com outros açúcares nenhuma das combinações foi capaz de abaixar o pH do meio para menos de 5,5 após 7 dias, enquanto com a mistura de sorbitol com os outros açúcares a queda no pH tornou-se evidente. Após 2 anos de uso de goma de mascar contendo xilitol não houve evidência de seleção microbiana capaz de metabolizar o xilitol. Com relação à ocorrência de cárie, os autores afirmam ter ocorrido substancial redução na incidência de cárie no grupo que usou xilitol, comparado com os outros dois grupos que utilizaram sacarose e frutose. Em geral, a placa foi incapaz de produzir ácido na presença de xilitol.

A partir destas observações, outros autores desenvolveram novos estudos tendo os substitutos da sacarose como objeto de suas observações, sendo que entre eles, o xilitol destaca-se pelas suas características, sendo invariavelmente utilizado nas comparações com outros adoçantes alternativos. Edwardsson, Birkhed e Mejare (1977), compararam a produção ácida de estreptococos e lactobacilos com vários tipos de adoçantes alternativos, a saber Lycasin® (mistura de dextrose com sorbitol), sorbitol, maltitol, xilitol e glicose em soluções na concentração final de 1%. Observaram que o manitol não foi fermentado por nenhum estreptococo, mas foi fermentado por todos lactobacilos. O Lycasin® foi fermentado pelos lactobacilos e por alguns estreptococos, como o sorbitol. Porém nenhum dos estreptococos ou lactobacilos foi capaz de fermentar o xilitol.

Birkhed et al. (1979), visando determinar se os álcoois-açúcares com o tempo tornam-se metabolizáveis pelos microorganismos da placa, levando ao aumento da produção ácida e ao maior risco de cárie, analisaram número de estreptococos anaeróbios facultativos, SM e lactobacilos antes e após 3 meses do consumo freqüente de pastilhas contendo tais substâncias. 110 indivíduos, divididos em 5 grupos (controle, sorbitol, maltitol, Licasin® e xilitol), foram instruídos a consumirem 2 pastilhas de xilitol, 4 vezes ao dia, por 3 meses. O valor do pH foi medido após bochecho por 30 segundos, com 10 ml de solução, contendo a substância teste na concentração de 50%, uma semana antes do experimento e após o final de 3 meses de experimento. A produção ácida não foi registrada no biofilme antes ou após o consumo das pastilhas para o grupo que fez o bochecho com xilitol, o que não ocorreu para os outros grupos, porém sem significado estatístico. Os autores concluíram que

não há evidência da adaptação da microbiota oral ao xilitol e ao Lycasin® (mistura de dextrose e sorbitol), embora tenha sido relatada tendência da adaptação da microbiota ao uso do sorbitol e maltitol. O aumento da produção ácida para estes adoçantes foi pequena, sugerindo que consumos mais intensos e por períodos maiores poderiam revelar maiores mudanças no número de estreptococos e lactobacilos na placa.

O efeito de outro adoçante, a palatinose, também conhecida como isomaltose, que é um açúcar de baixo potencial cariogênico, muito usado no Japão, foi verificado por Lingström et al. (1997). Encontrado naturalmente em pequena quantidade no mel, é produzido industrialmente a partir da conversão enzimática da sacarose. O poder de doçura é de 0,35 a 0,45 comparado ao da sacarose. Ao contrário dos álcoois-açúcares (sorbitol e xilitol) não causa o desconforto gastro-intestinal conhecido como diarreia osmótica, pois é completamente hidrolizada no intestino. O nível de glicose sanguínea e a resposta insulínica também são baixos, menor que da sacarose, o que torna a palatinose muito útil para pacientes que sofrem de diabetes. Embora tendo potencial cariogênico baixo, a microbiota oral pode se adaptar a este açúcar. No entanto, não foi relatada queda no pH do biofilme em seres humanos para valores inferiores a 6,1 com seu uso. Investigando a formação e o pH da placa após enxágües freqüentes com produtos contendo palatinose e xilitol, comparados com outros contendo somente a palatinose ou somente o xilitol separadamente, observaram que a palatinose produziu maior queda do pH da placa, quando comparada ao xilitol separadamente, com diferença estatística significativa. Quando a mistura xilitol + palatinose foi comparada com a sacarose, esta diminuiu mais o pH da placa. Houve diminuição nos níveis salivares de *S.mutans* com o uso do xilitol, enquanto pequeno

aumento foi verificado com a palatinose, sem significado estatístico. O uso do xilitol proporcionou menores índices de placa, com diferença estatística, quando comparado com a palatinose.

Mäkinen et al. (2001), avaliaram 16 indivíduos especiais, na maioria portadores da Síndrome de Down, divididos em 2 grupos experimentais, um utilizando goma de mascar contendo xilitol e outro contendo eritritol, na freqüência de 5 vezes ao dia, por 2 meses. Após o período experimental, o peso da placa e a contagem de *S.mutans* foi significativamente menor no grupo que usou xilitol e não se alterou para o grupo do eritritol. Em sua conclusão, os autores afirmam que, baseados em informações de trabalhos bacteriológicos e vários outros de triagens clínicas envolvendo o xilitol, este açúcar parece realmente ter um efeito bioquímico específico em certas cepas de *S.mutans*.

Wennerholm et al. (1994), realizaram estudo *in situ* com uso de aparelhos removíveis em 17 indivíduos com mais de 10^5 ufc/ml de saliva, distribuídos aleatoriamente em 4 grupos, cada voluntário passando por todos os grupos, usando 4 tipos diferentes de gomas de mascar, a saber: com 70% de xilitol, 35% de xilitol e 35% de sorbitol, 17,5% de xilitol e 52,5% de sorbitol e 70% de sorbitol. Com relação aos níveis salivares de SM, os resultados demonstraram que uso de goma de mascar com zero xilitol (70% sorbitol) induziu aumento significativo de SM, enquanto o uso do xilitol levou à diminuição. Para a goma contendo 70% de xilitol o valor foi estatisticamente significativo de zero e 17,5%. O uso de xilitol diminuiu SM tanto na placa dental quanto na saliva.

Para os valores de pH, após o bochecho com sorbitol, o pH final mais baixo foi detectado para aqueles que utilizaram 70% de sorbitol e o mais alto para o grupo que usou 70% de xilitol. Quando se fez o bochecho de glicose o pH caía sempre para 5,7, independente da goma que o indivíduo usou.

A perda de mineral ocorreu após o uso de cada uma das 4 gomas, embora a menor desmineralização tenha sido observada com o uso do chiclete com 35% de xilitol, colocando em questionamento a relação direta dose-resposta atribuída a esse produto.

Mäkinen et al. (1996), avaliaram indivíduos com 10 anos de idade, em estudo longitudinal de 40 meses, investigando o efeito de gomas de mascar na formação de placa. Os indivíduos foram divididos em 9 grupos, sendo um grupo controle (que não fez uso de goma de mascar) e 8 grupos experimentais, com gomas contendo xilitol, sorbitol, diferentes misturas desses dois substitutos e sacarose. Os resultados mostraram que o grupo que recebeu a goma contendo 100% de xilitol, 5 vezes ao dia, foi o que apresentou menor índice de placa.

Simons et al. (1997), observaram que o uso de gomas de mascar contendo uma mistura de xilitol e clorexedina, 2 vezes ao dia, por 14 dias seguidos, promoveu a redução do número de *S.mutans* tanto para o grupo teste (que recebeu a goma de clorexedina) quanto para o controle (só goma contendo xilitol), porém para a goma teste, contendo clorexedina, a redução foi maior. Após 14 dias, foram observadas manchas extrínscas no esmalte de alguns pacientes do grupo teste. Interessante notar que, enquanto a clorexedina é um composto sintético, o xilitol é um adoçante natural, podendo ser usado mais de 2 vezes ao dia e, sob tais condições, proporcionar maiores vantagens para quem o utiliza como agente promotor de saúde. Ainda tentando associar benefícios da terapia com clorexedina e xilitol, Hildebrandt e Sparks

(2000), afirmam que nem todas as pessoas respondem favoravelmente à terapia antimicrobiana com clorexedina. Além disso, logo que o tratamento com clorexedina é interrompido, rapidamente os níveis salivares retornam aos valores apresentados antes do tratamento, sendo este período variável de indivíduo para indivíduo, durando em média 3 meses. Para manter esta supressão deve-se procurar terapias alternativas, uma vez que o uso prolongado da clorexedina não é recomendado devido a efeitos colaterais. Assim, os estes autores conduziram este estudo com a finalidade de observar a capacidade do xilitol, utilizado em gomas de mascar, manter a supressão de SM após o indivíduo cessar tratamento com clorexedina. Para isto, 151 indivíduos foram divididos e 3 grupos aleatórios: controle, placebo e teste. Todos faziam bochechos 2 vezes por dia (manhã e antes de dormir) com 15 ml de gluconato de clorexedina 0,12%, durante 2 semanas. Foi comparado o efeito do uso de gomas de mascar contendo xilitol, com o efeito de gomas placebo. A análise estatística mostrou diferença significativa entre o grupo controle (não utilizou goma) e experimental e entre os grupos placebo e experimental. Não houve diferença entre o placebo e o controle. Os autores concluem que o xilitol pode prolongar a supressão de SM após a parada do tratamento com bochechos de clorexedina. Os autores também enfatizam que a proteção do xilitol não está ligada só ao aumento da salivação, pois, se assim fosse, o placebo também funcionaria e em sua conclusão sugerem que, como tais produtos existem no mercado, este protocolo poderia ser imediatamente aplicado à prática clínica.

A glicosiltransferase é a enzima responsável pela síntese de glucanos solúveis e insolúveis a partir da sacarose. Existem 3 tipos de enzimas glicosiltransferases produzidas pelo *S.mutans*: a GtfB (que sintetiza o glucano insolúvel 1,3), GtfD (que sintetiza o glucano solúvel 1,6) e GtfC (que sintetiza uma mistura de glucanos solúveis e

insolúveis). Wunder e Bowen (1999), examinaram 3 classes de compostos químicos (metais cáusticos, reagentes oxidantes e compostos açucarados) e suas capacidades de atuarem agirem como inibidores da atividade da glicosiltransferase, Entre os compostos açucarados estavam o xilitol, sorbitol e derivado da sacarose halogenada (Sucralose). Nenhum dos adoçantes, incluindo o xilitol, apresentaram efeito inibitório sobre a atividade da glicosiltransferase.

Estudos avaliando o efeito do xilitol têm sido realizados por um grupo de pesquisadores na Finlândia. Söderling et al. (1991), utilizando voluntários de estudo anterior realizado em Ylivieska, separaram indivíduos que participaram do primeiro trabalho em 2 grupos: experimental (usaram o xilitol no estudo anterior – denominado grupo X) e grupo controle (não usaram xilitol no trabalho original - denominado grupo C). Neste novo experimento, os 2 grupos foram divididos em 2 subgrupos. O grupo experimental foi constituído por indivíduos que utilizaram xilitol no primeiro estudo e continuaram consumindo-o até o momento do segundo estudo (denominado subgrupo XX) e o subgrupo 2 (denominado CX), constituído por indivíduos que não haviam consumido xilitol no experimento original, mas que iniciaram o consumo por conta própria após o experimento. Da mesma forma, foi subdividido o grupo controle: subgrupo CC, constituído por indivíduos originalmente do grupo controle (não usaram xilitol durante o primeiro estudo) e que continuaram não consumindo xilitol e o subgrupo XC, formado por indivíduos que originalmente pertenceram ao grupo experimental (usou o xilitol pelos 2 anos da pesquisa original) mas que, findada a pesquisa, pararam de consumir o xilitol por opção própria. Estes indivíduos foram reexaminados e como resultados, os autores observaram que menor quantidade de biofilme foi encontrada nos grupos experimentais XX e CX, comparando-se com o grupo controle (CC e XC). A quantidade de biofilme foi mais baixa no grupo XX e não houve diferença estatística

entre XC e CC, sugerindo que a parada da utilização do xilitol favorece a recolonização. O número de SM nas áreas proximais também foi avaliado e relatado por Isokangas et al. (1991), sendo significativamente menor nos consumidores habituais de xilitol (XX) do que nos não usuários (CC). No subgrupo XX não houve lesões de cáries nas superfícies estudadas. Os indivíduos dos grupos XX, XC, CX apresentaram índices de cáries proximais menores do que indivíduos que nunca usaram xilitol (CC). Os autores atribuem este fato à menor adesividade das cepas tolerantes ao xilitol e na diminuição do metabolismo celular com a formação do xilitol-5-fosfato. Concluíram que o consumo de xilitol por anos pode levar a prevenção também de lesões de cárie interproximal.

Söderling et al. (1997), avaliaram o efeito de gomas de mascar com xilitol, com mistura xilitol-sorbitol e gomas placebo sobre a placa e saliva de indivíduos consumidores de xilitol. Todos participantes haviam sido, de uma maneira descontrolada, consumidores de xilitol pelo período mínimo de um ano antes do estudo. Após 1 mês privados do consumo de xilitol iniciou-se o período experimental, onde ocorreu o consumo do xilitol, da mistura xilitol/sorbitol e do placebo, através do uso de gomas, que eram utilizadas de 3 a 5 vezes ao dia. Amostras de biofilme dental e saliva foram coletadas no início do trabalho e no final de 2 semanas experimentais. Os valores obtidos entre os grupos no início não diferiam entre si. Após o período teste, a mistura xilitol+sorbitol pareceu ter a mesma performance do que o grupo do xilitol sozinho, com relação a diminuição da quantidade de placa. No entanto, a proporção de *S.mutans* diminuiu significativamente no grupo do xilitol.

Na tentativa de utilizar esta ação na redução de *S.mutans* promovida pelo xilitol na prevenção da transmissão vertical deste microorganismo, o mesmo grupo de

pesquisadores realizou estudo longitudinal envolvendo gestantes e seus filhos. Söderling et al. (2000), avaliaram 106 pares de mães que possuíam altos níveis salivares de SM (maior que 10^5 cfu/ml) e seus filhos. Essas mães foram selecionadas para o estudo ainda gestantes e foram divididas em 3 grupos: o grupo que usou xilitol, o grupo que recebeu aplicação de flúor e o grupo que recebeu tratamento com clorexedina. Após o nascimento da criança, os pares mães/filhos eram examinados quando as crianças tinham 6 meses, 1 ano e 2 anos de idade. No grupo do flúor (Duraphat®) e da clorexedina (EC® 40%) as mães receberam aplicação de vernizes aos 6, 12, 18 meses após o parto. No grupo do xilitol as mães mascaravam gomas contendo 65% de xilitol, 2 a 3 vezes ao dia, durante 2 anos. As crianças não receberam nenhum tratamento. Ao completarem 1 ano de vida, para as crianças que mostraram níveis de SM detectáveis, os autores obtiveram os seguintes resultados: 6,8% das crianças infectadas eram filhas de mães que pertenciam ao grupo que usou o xilitol; 18,2% eram filhas de mães que haviam participado do grupo flúor e 3,6% delas eram crianças cujas mães haviam participado do grupo clorexedina (sem diferença estatística). Aos 2 anos de idade os níveis detectáveis foram: 9,7% para as crianças de mães participantes do grupo xilitol, 28,6% para crianças de mães participantes do grupo clorexedina e 48,5% para crianças das mães que participaram do grupo que usou verniz de flúor. Este estudo explora a possibilidade das mães usuárias de xilitol diminuírem a transmissão de SM aos filhos e, conseqüentemente, o risco de desenvolvimento de cárie.

Após 2 anos do final do experimento anterior, ou seja, quando as crianças completaram 4 anos, Söderling et al. (2001), realizaram novo estudo nos mesmos voluntários. As mães haviam sido instruídas para interrupção do tratamento proposto pelo estudo anterior quando seus filhos completassem 2 anos e as crianças foram

novamente reavaliadas aos 3 e aos 6 anos de idade, sempre com análise microbiológica da saliva. A porcentagem de colonização foi aumentando a medida que o tempo foi passando, para as crianças de todos os grupos. Porém, ao exame de 3 anos, no grupo em que as mães haviam usado gomas de mascar com xilitol, apenas 27,6% das crianças haviam sido colonizadas pelo SM; no grupo das mães que usaram flúor 64,5% e no grupo da clorexedina 37%, com diferença estatística.

No exame das crianças aos seis anos de idade, ou seja, 4 anos após o tratamento das mães ter sido interrompido, os valores encontrados para a detecção de SM na saliva foram 51,6% para os filhos de mães que haviam participado do grupo do xilitol, 83,9% para o grupo flúor e 86,4% para o grupo clorexedina, novamente com significado estatístico. A conclusão que os autores chegaram foi que o xilitol pode retardar a transmissão e colonização por SM em crianças por período prolongado (até 4 anos), mesmo após a interrupção do seu consumo pelas mães. Um achado secundário deste estudo foi que a ocorrência de cárie nas crianças do grupo xilitol foram reduzidas em cerca de 70%, comparada com os outros 2 grupos. Este fato foi publicado por Isokangas et al. (2000). Os resultados revelam que indivíduos que aos 2 anos de idade ainda não haviam sido colonizados por SM, apresentavam menor experiência de cárie do que as crianças que haviam sido colonizadas até os 2 anos de idade e isto em todos os grupos (xilitol, clorexedina e fluoreto). Na idade de 5 anos, os filhos de mães que estavam no grupo do xilitol apresentavam menor experiência de cárie do que os outros 2 grupos, com diferença estatística. Esta redução foi de 71% entre grupo das mães que utilizaram xilitol e as que utilizaram fluoretos e de 74% entre as mães dos grupos que usaram xilitol e clorexedina. A diferença entre os grupos para indivíduos que realizaram tratamento com fluoreto e clorexedina não apresentou diferença estatística. Concluíram que o uso habitual de xilitol pelas mães está

associado de maneira estatisticamente significativa com a redução da infecção da criança e posterior e decorrente redução da cárie dental na dentição decídua.

Embora grande número de trabalhos utilize o xilitol como substituto de parte do açúcar na dieta, especialmente na forma de gomas de mascar e balas, alguns estudos investigam a ação do xilitol em outros produtos. Particularmente aqueles envolvendo pastas dentais são de interesse, pois os dentifrícios são considerados, até o momento, os maiores agentes preventivos no combate à cárie, especialmente pelo seu conteúdo de fluoreto, sendo este considerado o grande responsável pela diminuição da incidência de lesões, possibilitando a remineralização dental. Surge o questionamento se a adição de xilitol poderia aumentar, de alguma maneira, o efeito protetor do dentifrício na prevenção da cárie. Assim, Twetman e Petersson (1995), avaliaram 65 crianças, divididas em 2 grupos, 33 delas no grupo experimental e 32 no controle, instruídas para utilizarem o dentifrício 2 vezes ao dia, em escovação após o café da manhã e antes de dormir durante 2 minutos. As crianças do grupo teste utilizaram dentifrício acrescido de 9,7% de xilitol. Em contraste com trabalhos publicados, os resultados não apresentaram diminuição salivar de SM após o período do estudo, tanto para o grupo controle como para o experimental. Os autores sugerem que a dose de xilitol utilizada pode ter sido baixa, (cerca de 0,1 g por dia dividido nas 2 escovações) já que em gomas de mascar a dose de xilitol diária usada é cerca de 50 a 100 vezes maior do que a utilizada neste dentifrício.

Sintes et al. (2002), utilizaram 2 tipos de dentifrícios em crianças escolares, um contendo 0,836% de monofluorofosfato de sódio (1.100 ppm) acrescido de 10% de xilitol e outro dentifrício com 0,836% de monofluorofosfato de sódio (1.100 ppm) sem a adição de xilitol, como controle. Após 30 meses, a média de incremento no CPOD

para o grupo que usou a pasta com xilitol foi 13,9% mais baixa do que no grupo das crianças que usaram pasta sem xilitol, sendo a diferença entre os valores considerada estatisticamente significativa ($p < 0,05$), reforçando assim os benefícios do uso do xilitol em dentifrícios para a prevenção de lesões de cárie.

2.4 *Streptococcus mutans* e a tolerância ao xilitol

Embora a não utilização do xilitol pelos estreptococos orais, em especial pelo *S. mutans*, seja comprovada pelos trabalhos citados, há relatos de *S. mutans* com tolerância ao xilitol.

O trabalho pioneiro que estudou a presença de células resistentes ao xilitol foi de Knuutila e Mäkinen (1975), cuja proposta foi estudar a ação das enzimas dextranos-hidrolíticas e enzimas formadoras de polissacarídeos em *S. mutans*. A presença de xilitol na concentração de 2,5% no meio contendo 0,25% de glicose retardou o crescimento das células. Porém, após período de 2 meses e meio, o crescimento da cultura, no meio contendo xilitol, tornou-se similar ao do meio contendo apenas glicose. Estas células, que cresceram em meio contendo xilitol foram denominadas “células-xilitol”. Os autores verificaram que o xilitol não interferiu no metabolismo e transporte da glicose, pois a quantidade de glicose consumida pelos microrganismos foi a mesma nos dois meios. Houve inibição de aproximadamente 25% na formação de polissacarídeo extracelular no meio contendo xilitol e o crescimento das células foi um terço daquele observado no meio normal. A medida

que as células conseguiam crescer no meio com xilitol, também utilizavam mais efetivamente peptídeos e aminoácidos. Estes resultados fizeram os autores concluir que seria improvável a hipótese de ocorrer indução de enzimas envolvidas no metabolismo do xilitol, quando este estivesse presente no meio. No entanto, a adaptação de células para tolerar o xilitol foi observada e, supostamente, poderia ser por alterações induzidas no transporte e metabolismo de glicose, aminoácidos e outros compostos.

A idéia inicial da ocorrência da adaptação metabólica ao xilitol também foi proposta por Gauthier, Vandeboncoeur e Mayrand (1984). Após transferências de células bacterianas para meios de cultura contendo diferentes concentrações de xilitol (de 0,5 a 2%), perceberam que ocorria o aumento no tempo requerido para as células atingirem a fase estacionária (tempo de geração bacteriana). Com repetidas transferências da cultura ocorria diminuição progressiva do tempo de geração das bactérias, indicando, assim, que a perda de sensibilidade ao xilitol seria um fenômeno progressivo, sugestivo de processo adaptativo. Uma vez obtida esta população de células insensíveis, os autores também observaram que ela não voltava ao estágio de sensibilidade anterior. Os resultados permitiram aos autores descartarem a hipótese sugerida de haver repressão de enzimas pré-existentes que permitiriam à célula utilizar o xilitol. Também abandonaram a idéia de ocorrer repressão de um sistema enzimático responsável pelo fenômeno da inibição, pois as células sensíveis não puderam crescer na presença de xilitol e as que cresceram não puderam retornar ao estado de sensibilidade após a remoção do xilitol. Outra hipótese proposta pelos autores, a perda de um plasmídeo codificado por um sistema enzimático, também foi abandonada, uma vez que nenhum plasmídeo foi encontrado nas células sensíveis, levando os autores concluir que a insensibilidade ao xilitol resultaria de um evento

mutacional. No entanto, a inibição do crescimento não ocorria quando células bacterianas eram cultivadas em meio contendo xilitol, porém na presença de frutose, sugerindo que a utilização do xilitol poderia estar ligada ao sistema de transporte da frutose, uma vez que esta preveniria a captação de xilitol.

Birkhed (1994), discutiu se o consumo de xilitol poderia resultar na progressiva perda de sensibilidade pela bactéria ao produto. Este autor alerta que esta “adaptação” do xilitol não deve ser erroneamente interpretada como podendo levar ao risco do aumento da produção ácida novamente, ou ao aumento do número de SM, como ocorre com o sorbitol. Não há evidências que estas cepas consigam crescer com o consumo de xilitol, gastando-o ou utilizando-o de alguma forma, ou que produzam ácidos a partir dele. Desta forma, conclui que não foi observada adaptação da flora ao uso do xilitol, até o momento.

Trahan, Bourgeau e Breton (1996), com propósito de saber se células com resistência ao xilitol poderiam ser selecionadas a partir de crescimento *in vitro* em meio com frutose, sacarose, lactose e glicose, estudaram o comportamento de 3 colônias de *S.mutans* laboratoriais e 3 clínicas. Transferiram essas 6 amostras repetidas vezes para os 4 meios experimentais, com os 4 açúcares na ausência e presença do xilitol. Dependendo do açúcar estudado a presença do xilitol ajudou a selecionar cepas resistentes, mas não necessariamente em todos os grupos. As 6 colônias rapidamente se tornaram xilitol resistentes no meio glicose + xilitol. Os 3 isolados clínicos também tornaram-se resistentes após 9 a 16 transferências do meio frutose + xilitol e/ou no meio sacarose +xilitol, enquanto nenhuma das 3 colônias laboratoriais tornaram-se resistentes, após 16 transferências, em nenhum dos meios.

O transporte e a fosforilação do xilitol pelo sistema fosfotransferase em *S.mutans* tornou-se proposta de estudo para muitos trabalhos. Trahan et al. (1981), avaliaram se este sistema de transporte poderia estar envolvido com o transporte do xilitol. Xilitol marcado com Carbono 14 radioativo foi imediatamente acumulado no citoplasma de *S.mutans* ao mesmo tempo que a inibição do crescimento era observada. Comparando-se os valores para o acúmulo de Carbono 14 em cepas sensíveis e resistentes, estes dois fenômenos não foram verificados nas cepas resistentes. Assim, concluíram que há correlação entre a captação de xilitol e inibição do crescimento bacteriano e sugeriram que a existência de alguma “falha” no mecanismo constitutivo do transporte da frutose poderia ser a causa da ocorrência do tipo fenotípico da célula xilitol-insensível.

Somente em 1987, que as células demonstrando tolerância ao xilitol, denominadas inicialmente células-xilitol por Knuutila e Mäkinen (1975) e células xilitol-insensíveis por Trahan et al. (1981), receberam a denominação de células xilitol-resistentes sugeridas por Trahan e Mouton (1987). Avaliando a sensibilidade ao xilitol, em meio glicosado, sem ou com a adição de 0,5% de xilitol, as curvas de crescimento bacteriano revelaram a presença de uma divisão entre os isolados, pois o crescimento de algumas cepas foi reduzido quando o xilitol era acrescentado ao meio de cultura. As cepas que apresentaram restrição no crescimento foram consideradas xilitol-sensíveis (X^S). As cepas, cujos padrões de crescimento eram idênticos em meio com e sem xilitol, foram denominadas xilitol-resistentes (X^R). A maioria dos isolados para consumidores crônicos de xilitol foi considerada xilitol-resistente (87%), enquanto nos indivíduos do grupo controle, não consumidores, esse valor foi de apenas 10%. O crescimento nas cepas X^S foi de 17 até 68% menor do que nas tolerantes. Observação

semelhante foi verificada por Trahan et al. (1992). Estudando biofilme dental e saliva de indivíduos determinaram a proporção de cepas *S.mutans* X^R no grupo experimental (que usou chiclete com xilitol por 2 anos) e controle (que não usou o xilitol). A proporção de *S.mutans* X^R na saliva dos não usuários de xilitol foi significativamente muito mais baixa (35%) do que a proporção de X^R nos indivíduos usuários de xilitol (79%). Os resultados sugerem que o consumo de xilitol modifica a distribuição de SM entre placa e saliva, sendo os *S.mutans* X^R mais captados na saliva do que na placa e, uma vez estabelecida a população de X^R, esta se mantém por até 4 anos após a remoção do agente de seleção, ou mantendo seu uso mínimo e irregular.

A ocorrência de mutação, sugerida por Gauthier, Vandeboncoeur e Mayrand (1984), foi considerada improvável por Trahan e Mouton (1987), uma vez que o xilitol e seus metabólitos não são mutagênicos e que sua adição no meio resulta na seleção espontânea de uma população bacteriana naturalmente resistente, com mecanismo constitutivo frutose-PTS negativo. Os autores sugerem que este fato pode ser devido à existência de formas alternativas (alelos) de um mesmo gene. Assim, 2 genótipos de *S.mutans* poderiam coexistir na flora oral do homem moderno e que a toxicidade provocada pelo xilitol foi, provavelmente, responsável pela eliminação progressiva de cepas X^S e reposição das cepas X^R nos indivíduos avaliados. Da mesma forma, com relação à possibilidade de existirem diferenças genotípicas entre as formas X^R e X^S, Sato, Yamamoto e Kizaki (2000), isolaram o gene *gbcC*, que codifica a proteína glucanoC, envolvida no processo de agregação dextrano-dependente em *S.mutans*. A expressão deste gene fica elevada em condições de estresse, como a que ocorre em células cultivadas repetidamente na presença de xilitol. A persistência da expressão constitutiva do gene *gbcC* em cepas X^R, mesmo após 10 transferências seriadas em

meio sem xilitol, pode sugerir que a emergência destes clones seja resultado de uma mutação para obter um ganho de função e, assim, sobreviver. No entanto, quando células resistentes foram submetidas ao seqüenciamento direto do DNA através de PCR, as seqüências de nucleotídeos se apresentaram exatamente idênticas às das cepas sensíveis. Portanto, o aparecimento da resistência não pôde ser explicado por uma mutação, sugerindo que o envolvimento de outros fatores sejam mais prováveis. Concluem que há necessidade de investigar se estas cepas resistentes já existem na cavidade de usuários habituais de xilitol.

Roberts et al. (2002), estudando cepas de crianças que consumiram lanches contendo xilitol por 4 semanas, avaliaram SM e analisaram a resistência ao xilitol, através do estudo das curvas de crescimento. As cepas resistentes foram consideradas as que cresciam da mesma maneira na ausência ou presença de xilitol a 0,5% no meio. Foi utilizado o método de análise biomolecular do PFGE para verificar similaridade genotípica antes e após xilitol. De 7 crianças avaliadas, 6 apresentaram o mesmo genótipo no início e após o experimento; apenas uma apresentou um genótipo no início e outro após exposição ao xilitol. Em todas 7 crianças os SM ficaram mais tolerantes após o consumo de xilitol, pois cresciam em ágar com 15% de xilitol.

O modo pelo qual o xilitol e outros açúcares são ou não captados para o interior da célula começou a ser investigado com o propósito de definir sua associação a um sistema específico de transporte. O efeito de vários açúcares foi estudado por Trahan e Mouton (1987), para determinar que mecanismo açúcar-PTS era responsável pela fosforilação do xilitol. Foi relatado que a presença de frutose ou sacarose no meio abolia a fosforilação do xilitol, porém a presença de xilitol no meio não afetava a fosforilação da glicose em cepas X^R ou X^S , mas parecia diminuir a fosforilação da frutose em cepas X^S . Verificaram, também, que cepas que apresentavam fosforilação

baixa ou ausente para o xilitol, tinham atividade frutose-PTS constitutiva extremamente pequena ou mecanismo frutose-PTS constitutivo negativo. O efeito do xilitol sobre a inibição do crescimento celular bacteriano aparentemente pode ser devido à falta de produção de xilitol-desidrogenase pelo *S.mutans* (ROGERS et al., 1991). Esta enzima está envolvida no metabolismo do composto xilitol-5-fosfato, o produto de transporte do xilitol pelo sistema frutose-fosfotransferase (frutose-PTS). A formação deste produto deve inibir o metabolismo dos açúcares úteis, que levam à falta do substrato e incapacidade de produção de energia celular, além do gasto energético para exportar o produto insolúvel resultante para fora da célula. Este “ciclo fútil” ocorre às custas de gastos de energia suplementar da célula, que resultaria num processo de bacteriostase. A tolerância ao xilitol tem sido demonstrada após exposição prolongada *in vitro* e falta do mecanismo celular constitutivo da frutose-PTS pode ser responsável pela tolerância ou resistência da bactéria ao xilitol (TRAHAN, 1995; KAKUTA et al., 2003).

Esta idéia também é sugerida em metabolismo de outros estreptococos como afirma Tapiainen et al. (2001). A partir do postulado que o xilitol nas concentrações de 1 a 5 % em meio de crescimento inibe o crescimento do *S. pneumoniae*, estes autores realizaram estudo avaliando o efeito do xilitol na presença de frutose e sorbitol. Foi detectada marcante inibição do crescimento bacteriano na presença de 5 % de xilitol, em meio básico com 0,2% de glicose. A inibição do crescimento induzida pelo xilitol foi prevenida por todas as concentrações de frutose utilizadas (1, 2,5 ou 5% de frutose), enquanto a adição de 1% de glicose, 1% de galactose ou 1% de sacarose não alterou o efeito do xilitol e a inibição de crescimento foi detectada. O sorbitol na concentração de 1, 2,5, e 5% não teve nenhum efeito no

crescimento dos pneumococos. O xilitol na concentração de 2,5% foi efetivo sozinho e combinado com o sorbitol. O mecanismo de ação do xilitol na inibição do crescimento dos pneumococos pode ser semelhante ao demonstrado em *S.mutans*, dando suporte à hipótese que esta inibição é devida ao envolvimento do sistema frutose-PTS e formação do composto insolúvel intracelular, o xilitol-5-fosfato, de maneira similar à que acontece na inibição do crescimento dos SM.

S.sobrinus (ATCC27352) e sua mutante xilitol-resistente foram cultivados em meio contendo frutose. Nas células X^R a atividade do mecanismo frutose-PTS constitutivo é praticamente desprezível ou inexistente. Ao contrário, as cepas X^S têm o mecanismo frutose-PTS constitutivo bastante funcional, que capta o xilitol acumulando xilitol-fosfato e apresentando inibição do crescimento quando 1% de xilitol é acrescido no meio, exceto quando a frutose está presente de forma predominante, pois a célula dá preferência para a captação de frutose. Porém neste trabalho de Trahan, Néron e Bareil (1991), foi verificado que algumas células X^R cresceram no meio com frutose, porém não acumularam o xilitol-5-fosfato no seu interior. Estes resultados levaram os autores a sugerir que a via metabólica alternativa, que utiliza o mecanismo frutose-PTS indutivo, pode levar estas células a metabolizarem a frutose, porém que esta mesma via seja incapaz de transportar o xilitol.

Benchabane et al. (2002), isolaram e caracterizaram o código genético para o mecanismo constitutivo da frutose-PTS em *S.mutans*. Para isso estudaram o gene *fxpC*, que codifica o mecanismo constitutivo frutose/xilitol-PTS. Como resultado obtiveram que a mutante defeituosa para o gene *fxpC* foi completamente resistente ao xilitol e nenhuma diferença foi vista no tempo de geração na presença ou ausência do xilitol. A inativação do *fxpC* resulta na cepa resistente ao efeito tóxico do xilitol. Outro

achado interessante é a presença de seqüências deste gene no genoma de outros estreptococos, incluindo o *S. pneumoniae*.

Com relação ao argumento de que cepas de *S. mutans* X^R possam ser menos virulentas que as suas correspondentes X^S, Beckers (1988), avaliou a influência do xilitol no estabelecimento e cariogenicidade de *S. mutans* em ratos. Desenvolveu cepas *S. mutans* X^R (GAUTHIER; VANDEBONCOUER; MAYRAND, 1984) e comparou com sua homóloga sensível (X^S), cuja taxa de crescimento e produção ácida eram inibidas pela adição de xilitol na presença de glicose. Não foi encontrada diferença estatística para o estudo da aderência *in vitro* entre as cepas X^S e X^R. Ratos submetidos à dieta de glicose/xilitol apresentaram menor ocorrência de lesões em dentina, quando comparados ao grupo que usou dieta somente à base de glicose, com diferença estatística. Estes resultados permitiram ao autor concluir, portanto, que, cepas X^R podem ser consideradas menos virulenta do que suas correspondentes selvagens X^S.

Söderling et al. (2000), sugerem que o consumo rotineiro de xilitol pode trazer, como conseqüência na maioria das mães, a seleção de cepas xilitol-resistentes dentro de poucos meses do início do consumo. Estas cepas parecem ser mais facilmente dispersas na saliva, a partir da placa, do que as cepas xilitol-sensíveis. O efeito do xilitol na composição da microflora oral, especialmente na porcentagem de *S. mutans* X^R, tem sido estimado durar por muitos meses ou mesmo anos, após cessar o consumo habitual de xilitol e propõe o uso deste como forma alternativa ao uso de clorexedina na prevenção da transmissão de SM de mãe para filho.

Em contrapartida, Assev, Stig e Scheie (2002), compararam o metabolismo de glicose, frutose e produção de polissacarídeos extracelulares (PEC) utilizando isótopos

de Carbono 14, em células de *S.mutans* X^R e X^S . Após a adição de xilitol no meio BHI, o crescimento bacteriano nas células sensíveis foi diminuído em aproximadamente 40%, sendo que o xilitol não produziu efeito sobre o crescimento de células X^R . Com relação ao metabolismo de xilitol, só foi encontrada a presença do metabólito xilitol-5-fosfato nas células sensíveis, mas não nas resistentes. Os resultados destes autores não confirmam que cepas X^R são menos cariogênicas do que células X^S . Pelo contrário, neste trabalho as células X^R produziram mais ácido do que as X^S e o potencial para produzir PEC foi igual nas duas culturas, o que sugere que o potencial menos adesivo das cepas X^R não está relacionado com formação de PEC. Assim, se assumirmos que *S.mutans* X^R , selecionados através do consumo de xilitol, sejam menos virulentos que *S.mutans* X^S , esta redução da virulência deve estar relacionada a outros fatores, que não a formação ácida a partir da glicose e de polissacarídeos a partir da sacarose.

Hrimech et al. (2000), mostraram que células marcadas com aminoácidos e Carbono 14 foram analisadas com relação à produção de duas proteínas em situação de estresse celular, HSP-60 e HSP-70. Em ambos fenótipos, X^R e X^S , o estresse provocado pelo aumento de temperatura levou ao aumento da quantidade de HSP-60 e HSP-70 e diminuiu a intensidade de outras proteínas formadas. A exposição ao xilitol por sua vez, diminuiu em 50% a produção destas duas proteínas sob o estresse ao calor (HSP-60 e HSP-70) nas cepas X^S , mas não nas cepas X^R . Isto só aconteceu com o uso do xilitol, embora os autores tenham testado outros poliálcoois. Outras alterações na produção de proteínas também foram verificadas nas cepas X^S , enquanto nas cepas X^R as alterações não ocorreram. Os resultados sugerem que o xilitol possa ser um forte inibidor do metabolismo bacteriano e que, aparentemente, não produz efeito

na produção de proteínas nas cepas X^R , mas afeta sobremaneira o metabolismo proteico nas X^S . A concentração inibitória do xilitol ainda é controversa na literatura, variando de 0,1 a 2%.

Söderling, Trahan e Lenader-Lumikari (1998), compararam o padrão de crescimento de 5 pares de cepas clínicas (saliva) e laboratoriais de *S.mutans* X^R e 5 pares X^S (cepas clínicas e laboratoriais) e estudaram a diferença na habilidade destas cepas hidrolizarem peptídeos e proteínas da saliva. Utilizando 2 tipos de saliva humana, com bom complemento de glicose e outra com complemento deficiente, os padrões de crescimento entre X^R e X^S diferiram muito discretamente, sem diferença estatística, sendo, em ambos, menores que a referência usada, *Streptococcus sanguis*. Com relação ao metabolismo de proteínas, todas os pares X^R e X^S das amostras clínicas e laboratoriais mostraram atividade protease e peptidase baixa e bastante similar. Isto sugere que a capacidade intracelular de utilizar peptídeos entre cepas X^R e X^S seja muito semelhante.

Entre os métodos de reações biomoleculares mais utilizados para identificar e genotipar diferentes amostras de microorganismos, Li e Caufield (1998), comparando o método AP-PCR com tipagem de DNA em genoma de *S.mutans*, encontraram grande concordância entre os métodos, afirmando que o AP-PCR pode ser usado na genotipagem de bactérias em estudos epidemiológicos e taxonômicos, sendo capaz de detectar polimorfismos entre os diferentes isolados de *S.mutans* e que o método é confiável, reprodutível e informativo. Também mostra-se vantajoso para estudos epidemiológicos de prevalência, estudos de virulência/não-virulência e tipos clonais de SM. Ainda, o AP-PCR tem potencial de permitir o processamento de grande número

de isolados de SM obtidos, por exemplo, em estudos de transmissão longitudinal. Foi verificada também, a possibilidade de reprodutibilidade do método, quando usado para detecção de cepas do mesmo indivíduo coletadas em diferentes momentos, tornando-o assim um método útil para estudos de identificação e diversidade de genomas. Verificaram também que houve grande similaridade com o índice padrão de bandas formado para o método AP-PCR do que com o método controle, sugerindo que os padrões de banda formados com o AP-PCR (8 a 12 bandas) mostram menos diversidade do que aqueles apresentados pela tipagem do DNA cromossômico, sendo, portanto, o uso do AP-PCR mais fácil. Estes relatos foram confirmados pelos trabalhos de Longo, Mattos-Graner e Mayer (2003) e Lembo (2005).

Grönroos e Alaluusua (2000), consideram o AP-PCR confiável e eficiente para distinguir isolados de *S.mutans*. Com o uso de AP-PCR, segmentos sortidos de DNA para um organismo alvo são ampliados com o uso de “primers” de seqüências arbitrárias. A maior vantagem do método AP é não haver necessidade do conhecimento prévio do seqüenciamento do DNA do organismo pesquisado. É relativamente fácil e rápido de ser realizado comparado com outras técnicas, o que torna o método mais atraente (SAARELA et al., 1996). Estes autores estudaram se o método AP-PCR poderia ser usado para diferenciação dentro da mesma espécie, sorotipos e clones de isolados clínicos de SM e compararam o poder discriminatório do método com técnicas de ribotipagem mais trabalhosas. Como resultados obtiveram que a habilidade discriminatória do AP-PCR foi levemente inferior à ribotipagem e que a habilidade do AP-PCR detectar heterogeneidade de isolados de *S.mutans* no mesmo indivíduo foi considerada muito boa.

3 PROPOSIÇÃO

Os propósitos deste estudo foram:

- Verificar se há ocorrência na diminuição dos níveis salivares de *S.mutans* em indivíduos após a utilização freqüente e regular, mas por curto período de tempo (30 dias), de gomas de mascar contendo pequena concentração de xilitol (15%).
- Verificar se os valores obtidos com a utilização do xilitol se mantêm depois de 30 dias após a suspensão do uso do produto.
- Verificar a similaridade genotípica de *S.mutans* no mesmo indivíduo nos 3 diferentes momentos do estudo: antes do experimento, 30 dias após o uso do xilitol e 30 dias após a suspensão da utilização deste adoçante.
- Verificar se há ocorrência *in vivo* de cepas *S.mutans* xilitol-tolerantes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos voluntários

Indivíduos adultos, estudantes de odontologia do curso de graduação e pós-graduação da Faculdade de Odontologia do CB da Universidade de São Paulo, foram selecionados como voluntários. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em pesquisa sem seres humanos da FOUSP (Anexo A). Foi obtido consentimento por escrito de cada voluntário (Anexo B), após a informação oral e por escrito dos objetivos e métodos empregados nesta pesquisa.

Após a assinatura do termo de consentimento para participação, foram selecionados 12 indivíduos, que possuísem níveis salivares de SM maiores ou iguais a 10^5 u.f.c./ml, com idade adulta, portadores de dentição completa, que não apresentassem perda de dentes, doença periodontal, cavidades de cárie, restaurações provisórias ou de má qualidade. A determinação dos níveis salivares de SM foi realizada pelo teste da espátula (KÖHLER; BRATTHALL, 1979). Foram excluídos indivíduos que estivessem realizando qualquer tipo de tratamento dentário ou ortodôntico, ou que tivesse sido submetido ao uso de antibióticos por período de até 3 meses antes do início do estudo. Os voluntários foram instruídos a não utilizarem anti-sépticos orais no período do estudo longitudinal (60 dias). Nenhuma orientação foi dada com a finalidade de modificar hábitos de higiene ou dieta usuais destes voluntários.

Na fase experimental os voluntários selecionados foram submetidos a uso de goma de mascar (Happydent xylit®, Perfect Van Melle, Vinhedo, SP, Brasil) contendo 15% de xilitol, por período mínimo de 5 minutos, 5 vezes ao dia, durante 30 dias ininterruptamente. Cada goma tem o peso de 1,35 g, contendo, aproximadamente 0,20 g de xilitol, totalizando o consumo de 1,0 g de xilitol, por dia, para cada voluntário. A goma de mascar utilizada está representada pela figura 4.1.



Figura 4.1 – Fotografia da goma de mascar Happydent xylit®, da Perfect Van Melle, contendo 15% de xilitol, utilizada pelos voluntários

4.2 Coleta de saliva

A coleta da saliva de cada voluntário foi realizada em 3 momentos distintos: um dia antes do início da fase experimental, imediatamente após a fase experimental (30 dias a partir do início do uso do xilitol) e 30 dias após a interrupção do uso do xilitol (60 dias a partir do início do período experimental).

Para a coleta da amostra salivar os voluntários foram orientados a não realizarem higiene oral por pelo menos 2 horas antes da procedimento e a se dirigirem ao laboratório de Microbiologia Oral, ICB, USP. Saliva estimulada foi obtida

pela mastigação de 1g de parafina mastigável (Orion Diagnostica, Helsink, Finlândia) por 1 minuto. A saliva foi dispensada periodicamente no interior de um tubo de vidro.

4.3 Cultura e contagem bacteriana e estimativa dos níveis salivares

A seguir, alíquota de 1 ml de saliva foi imediatamente submetida à diluições seriadas em água peptonada e alíquotas de 100 µl de cada diluição foram semeadas em triplicata, na superfície de placas de Petri, contendo o meio Ágar Mitis Salivarius, (Difco, Sparks, MD, EUA) acrescido de 15% de sacarose e 69 UI de bacitracina (GOLD et al., 1973). As placas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ em estufa (ShellLab, mod.2123, Cornelius, OR, EUA) a 37°C durante 48 horas. Após a incubação, realizou-se a contagem numérica simples das colônias características de SM nas placas que apresentassem até 300 colônias, com auxílio de lupa 10 x (Hellige, Garden City, NY, EUA). Foi estimada, assim, a média do número de u.f.c de SM/ml de saliva para cada voluntário. A seguir, foram selecionadas entre 50 a 100 colônias de *S.mutans* por voluntário através das características morfológicas e transferidas para as superfícies das placas de Ágar BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Sparks, MD, EUA). Após a incubação por 24 hs em atmosfera de 5% de CO₂, as colônias foram raspadas com alças plásticas estéreis de 1µl e armazenadas individualmente em tubos para centrifuga de 1,5µl contendo glicerol a 20%, identificadas por nomes formados pela combinação de letras e números e mantidas em freezer à temperatura de -80 °C (mod. ULT 2586-3-D35, Revco, Asheville, NC, EUA) até o momento de seu uso.

4.4 Identificação da espécie e genotipagem

A identificação definitiva da espécie foi realizada por PCR usando iniciadores espécie-específicos (OHO et al., 2000) e a seguir as cepas foram genotipadas por AP-PCR (LI et al., 2001). As cepas utilizadas para controle positivo foram ATCC 25175 e GS-5.

4.5 Extração do DNA

Inicialmente foram selecionadas para o estudo 24 amostras identificadas como *S.mutans* pelas características morfológicas. Alíquotas de 100µL do estoque congelado em freezer foram semeadas em Ágar BHI, seguindo-se incubação por 24 horas, em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Após o desenvolvimento das colônias e confirmação da pureza, foi realizada a extração do DNA empregando a técnica descrita por Alam et al. (1999). Colônias foram removidas da superfície do ágar com auxílio de alças bacteriológicas descartáveis calibradas (1µL), 5µL foram ressuspensas em 300µL de água MilliQ em tubos para centrífuga de 1,5 ml e a suspensão agitada por 20 segundos em agitador mecânico de tubos (mod. 220-B2, Quimis, São Paulo, SP, Brasil). As células foram submetidas à lise através da imersão dos tubos em água fervente por 10 minutos. Os restos celulares foram

precipitados por centrifugação a 14.000 rpm durante 10 minutos em centrífuga refrigerada (mod. Centrifuge 5402, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 ml e armazenado em freezer a -80°C até o momento do uso.

4.6 Identificação de *S.mutans*

Para determinar identidade das cepas de *S. mutans* foi realizado o método descrito por Oho et al. (2000), e confirmado por Hoshino et al. (2004). Este método amplifica parte do gene *gtfB*, através do uso de iniciadores específicos para espécie *S. mutans*, resultando em um único amplicom de 517pb.

Os iniciadores utilizados para esta etapa do estudo foram o GTFB-F (5' ACTACACTTTCGGGTGGCTTGG 3') e o GTFB-R (5' CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC 3'). Cada reação de PCR foi realizada com a utilização de 1µM de cada iniciador (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 50µM de cada desoxinucleotídeo (DNTPs –A,T,C,G, Invitrogen), 5µl de tampão para PCR 10x (Invitrogen), 1,5mM MgCl₂, 1U de Taq polimerase (Invitrogen) e 3µl de DNA total, em reação de 25 µl.

Para a reação de PCR foram realizados 30 ciclos em termociclador (Peltier Thermal Cycler, mod.PTC-200, Watertown, MA, EUA). nas seguintes condições: desnaturação a 95°C/30seg, anelamento a 59°C/30seg e extensão a 72°C/1min. O controle negativo foi realizado com a adição da mistura padrão de PCR com o volume de DNA molde substituído por água. O controle positivo foi constituído da

mistura padrão de PCR acrescida de 3µl de DNA molde da amostra ATCC 25125. Os amplicons foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose 1% (Invitrogen) em tampão TAE (Tris acetato 40mM, EDTA 2mM, pH 8,5) e corados com brometo de etídeo (cat. n. E-8751, Sigma, Saint-Louis, MI, EUA). Como referência foi utilizado o marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen). Os géis de agarose foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Amersham mod. UV-20, Pharmacia Biotech, São Francisco, CA, EUA), documentados para estudo e fotografados pelo sistema de fotografia digital Photo PC 3100Z (EPSON Hemel-Hempstead, Inglaterra) e analisados pelo programa Syngene-GeneTools Analysis Software versão 3.03.03 (Syn Gene, Cambridge, Inglaterra).

4.7 Genotipagem

Quinze amostras por coleta para cada paciente, identificadas como *S. mutans* pela reação anteriormente descrita, foram selecionadas aleatoriamente para a genotipagem, pela técnica de RAPD-PCR. Para esta reação foi utilizado o primer OPA 2 (LI et al. 2001) (5' TGCCGAGCTG 3'). Como controle, em todas as reações, foi utilizada a amostra de *S. mutans* ATCC 25175. A reação foi realizada segundo os seguintes parâmetros: 5µl de DNA molde, 50 pmol do iniciador OPA-2 (Invitrogen), 200mM de DNTPs, 3,5U de Taq polimerase, MgCl₂ na concentração de 1,75 mM, 2,5µl de solução tampão 10x em volume total de 25µl. A amplificação foi realizada em termociclador de acordo com os seguintes parâmetros: desnaturaçã

inicial 94°C por 5 minutos, seguida de 45 ciclos de 94°C/30seg, 36°C/30seg, 72°C/1min e extensão final de 5 minutos a 72°C.

Após reação em termociclador, os amplicons foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose a 2% em tampão TAE, e corados com brometo de etídeo. Em seguida visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e documentados para estudo. Como referência também foi usado o marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen).

Os padrões gerados através de RAPD foram comparados visualmente e as cepas agrupadas conforme seus perfis. Os pesos moleculares das bandas foram calculados com o auxílio do sistema Syngene-GeneTools Analysis Software versão 3.03.03.

4.8 Tolerância ao xilitol dos genótipos de *S. mutans*

Após análise do perfil dos genótipos foi realizado um estudo de tolerância ao xilitol *in vitro* para até 3 amostras de cada um dos genótipos de *S. mutans* obtidos nas 3 etapas do estudo: antes, imediatamente após o consumo de xilitol e 30 dias após a sua interrupção.

As amostras selecionadas foram retiradas do freezer (-80°C) e 150 µl de cada amostra foram semeados em placas com Ágar BHI, cultivados em estufa de CO₂, a 37°C por 24 horas. Após o crescimento em ágar e confirmação da pureza das colônias, 1µl da cultura foi retirado da superfície da placa com auxílio de alças plásticas, calibradas e estéreis, e transferidos para 1ml de caldo BHI, cultivadas em

tubos de ensaio por 24 horas, em estufa de CO₂, à 37°C. Após 24 horas, alíquotas de 100µl de cada cultura foram transferidas para novos tubos de ensaio com 900µl caldo BHI e cultivados em estufa CO₂ durante 12 horas. Após 12 horas de incubação, a concentração de células foi ajustada até atingir em espectrofotômetro (UV/Vis. Spectrophotometer, mod. 6405, Jenway Ltd, Inglaterra) a medida de absorbância igual a 1, para filtro de 450nm (Abs₄₅₀ = 1). A seguir, alíquotas de 10µl de cada cultura foram inoculadas em poços de placas de ELISA com 96 poços, contendo 290 µl de caldo BHI (meio de cultura base) e caldo BHI acrescido de 1% de xilitol. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata para ambos os caldos. As placas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C, e a estimativa do desenvolvimento microbiano foi realizada pela medida da absorbância (A_{450nm}) em leitor de ELISA (Bio Rad Microplate Reader, mod. 680, Tokyo, Japão) no momento da inoculação e após a incubação por 2, 4, 8, 12 e 16 horas. Como controle negativo utilizou-se a amostra padrão ***S.mutans* UA 159**, sensível ao xilitol, e como controle positivo utilizou-se a amostra ***S.mutans* TW 17 (*frul*)**, xilitol-resistente, ambas gentilmente cedidas pelo professor Jason Tanzer, da Universidade de Connecticut, Health Center, Farmington, CT, EUA (TANZER et al., 2005).

5 RESULTADOS

Os 12 voluntários completaram a utilização da goma de mascar por 30 dias, sem relatos de efeitos colaterais ao seu uso, embora alguns deles tenham relatado cansaço muscular e dor leve na ATM, provocados pelo estresse mastigatório.

Entre os 12 voluntários submetidos ao uso da goma de mascar, 2 deles (T1 e T4) foram acompanhados somente até a 2ª coleta, não realizando a coleta 30 dias após a interrupção do uso do xilitol, uma vez que, neste período, houve necessidade de administração de antibioticoterapia nestes indivíduos, por prescrição médica, para tratamento de saúde.

5.1 Níveis salivares de SM

Os valores numéricos de u.f.c. de SM/ml obtidos para os 3 períodos de avaliação estão representados na tabela 5.1. A coleta (A) corresponde àquela realizada no início do experimento, antes da utilização da goma de mascar pelos voluntários; a coleta (B) corresponde à segunda coleta, ou seja, realizada 30 dias após o uso regular da goma contendo xilitol; (C) corresponde à coleta realizada 30 dias após a interrupção do uso da goma, ou seja, 60 dias a partir do início do experimento.

Tabela 5.1 - Média dos valores de SM em u.f.c./ml de saliva nas 3 etapas do experimento: início (A), 30 dias após o uso da goma de mascar contendo 15% de xilitol (B) e 30 dias após a interrupção do uso da goma de mascar (C)

Voluntário	Início (A)	30 dias (B)	60 dias (C)
T 1	$1,83 \times 10^6$	$3,80 \times 10^4$	*
T 2	$2,70 \times 10^5$	$3,20 \times 10^4$	$4,50 \times 10^5$
T 3	$1,97 \times 10^6$	$4,70 \times 10^4$	*
T 4	$8,20 \times 10^5$	$1,50 \times 10^4$	$4,20 \times 10^4$
T 5	$2,70 \times 10^5$	$1,80 \times 10^4$	$3,60 \times 10^4$
T 6	$1,90 \times 10^5$	$6,00 \times 10^3$	$1,90 \times 10^5$
T 7	$6,70 \times 10^5$	$3,00 \times 10^3$	$4,00 \times 10^3$
T 8	$1,20 \times 10^5$	$7,40 \times 10^4$	$9,00 \times 10^3$
T 9	$1,08 \times 10^6$	$1,97 \times 10^6$	$2,76 \times 10^6$
T 10	$1,64 \times 10^6$	$3,00 \times 10^2$	$1,50 \times 10^4$
T 11	$1,75 \times 10^6$	$5,80 \times 10^4$	$6,70 \times 10^3$
T 12	$5,60 \times 10^5$	$3,00 \times 10^2$	$5,00 \times 10^3$

* não foi realizada a coleta

Estes valores representam a média dos valores obtidos em triplicata para cada voluntário.

As formas coloniais e a apresentação das placas contendo as colônias de *S.mutans*, antes e após a utilização da goma de mascar contendo 15% de xilitol, estão representadas pela figura 5.1.

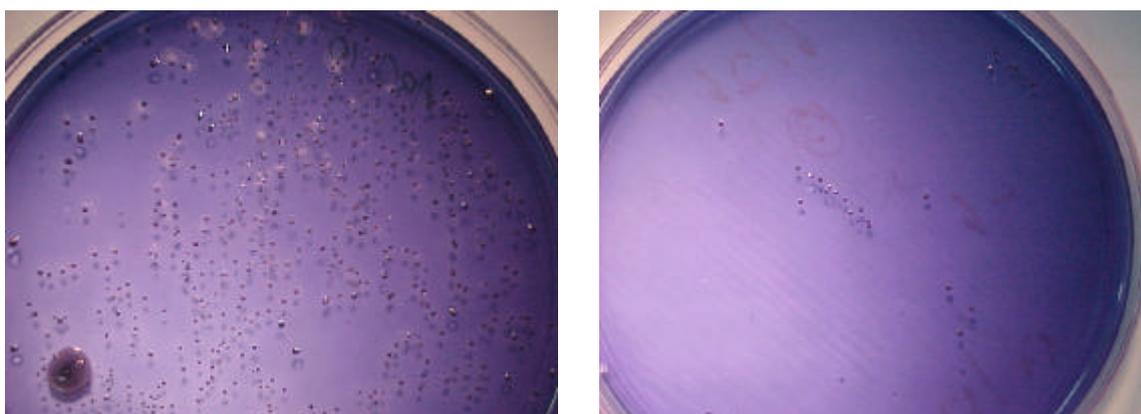


Figura 5.1 – Fotografia das placas de Ágar-MSB contendo a cultura de SM de saliva na diluição 10^3 , de um mesmo voluntário, antes e após a utilização das gomas de mascar contendo 15% de xilitol

A média e o desvio-padrão dos níveis salivares de SM obtidos nas diferentes etapas experimentais estão representados na tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Valores médios \pm desvio-padrão para os níveis de SM nas diferentes etapas experimentais: início (A), 30 dias após o uso da goma de mascar contendo 15% de xilitol (B) e 30 dias após a interrupção do uso da goma de mascar (C), em u.f.c./ml de saliva, com intervalo de confiança de 95%

Período	Valores médios de SM \pm desvio padrão (ufc/ml de saliva)
Início (A)	$9,80 \times 10^5 \pm 2,61 \times 10^5$ a
30 dias após o xilitol (B)	$2,17 \times 10^5 \pm 1,94 \times 10^5$ b
30 após interrupção do uso (C)	$3,50 \times 10^5 \pm 2,71 \times 10^5$ a

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os valores

Dez entre 12 voluntários apresentaram acentuada redução dos níveis salivares de SM em relação aos valores iniciais, enquanto valores maiores ou iguais aos iniciais foram encontrados nos outros 2 indivíduos. A distribuição dos níveis salivares nas 3 coletas para o grupo examinado pode ser observada na representação gráfica apresentada na figura 5.2. A análise de variância com medidas repetidas, utilizando-se o teste de Tukey para comparação entre os resultados obtidos nas diferentes etapas do experimento, revelam que ocorreu diminuição nos valores médios de SM observados no início do experimento, comparando-os com os valores após o uso do xilitol, sendo esta redução estatisticamente significativa. Entretanto, 30 dias após a interrupção do uso do xilitol, embora a média dos valores de SM

para alguns indivíduos ainda continuasse menor quando comparadas aos valores iniciais, esta redução não mostrou significância estatística.

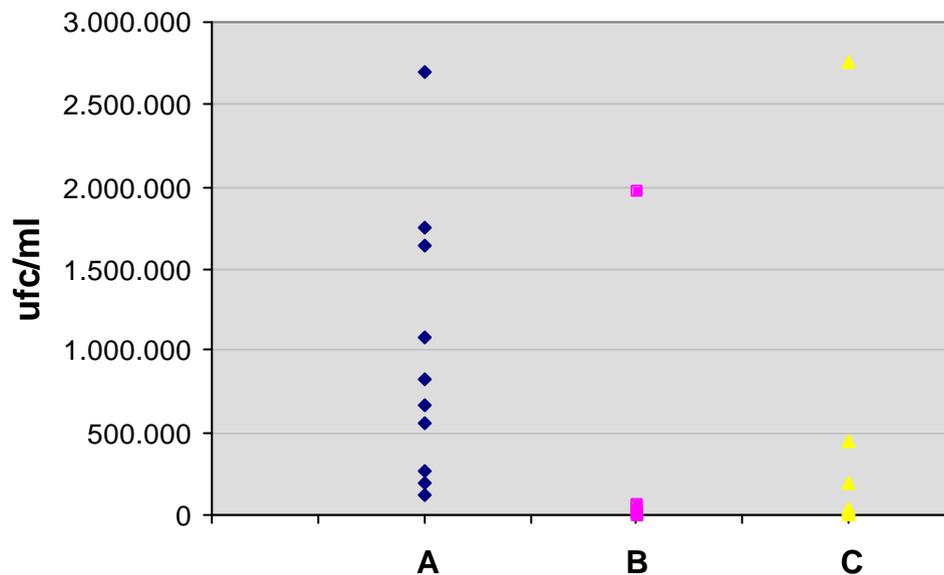


Figura 5.2 – Gráfico da dispersão dos valores dos níveis salivares de SM, obtidos por voluntário em cada coleta, (A), (B) e (C)

5.2 Identificação de *S. mutans*

Foram selecionadas aleatoriamente 24 amostras isoladas em cada uma das 3 etapas do estudo, dos dez voluntários que completaram o experimento, para a identificação de *S. mutans* através de amplificação por PCR, utilizando-se iniciadores homólogos ao gene *gtf-B*. Quando o DNA de *S. mutans* foi utilizado como molde, houve a formação de um produto único, identificado como única banda no gel de agarose, de peso molecular 517 pb,

como era esperado (Figura 5.3). Entre 698 amostras testadas, 670 foram identificadas como positivas para *S.mutans*, o que resulta numa confirmação de 96% para as amostras selecionadas pela morfologia colonial.

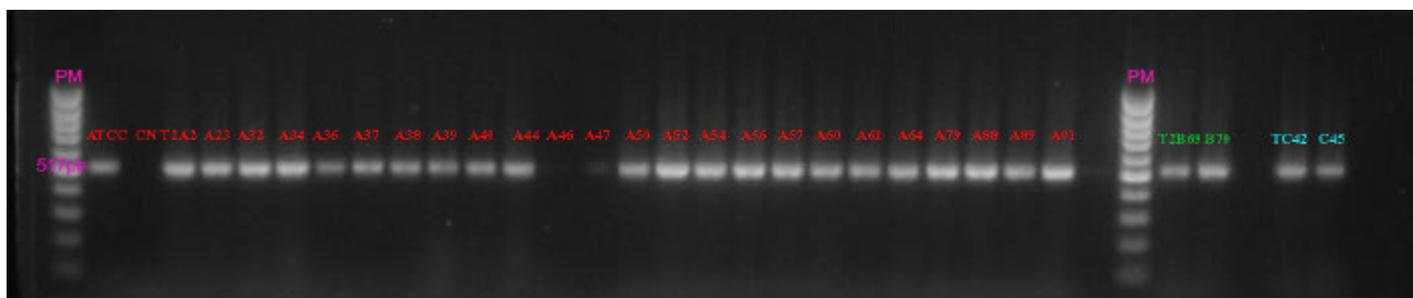


Figura 5.3 – Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, em tampão TAE, para identificação de isolados de SM da saliva, onde os produtos de PCR utilizando os iniciadores GtfBF e GtfBR foram submetidos à eletroforese, originando, para as amostras positivas, um produto de banda única com 517pb e ausência de produto nas amostras negativas. Peso molecular (PM) 100 bp DNA ladder (Invitrogen), ATCC (cepa padrão ATCC 25175 como controle positivo) e CN (controle negativo). As amostras analisadas estão em vermelho, verde e azul, representando as coletas (A), (B) e (C) respectivamente, isoladas do voluntário T2

5.3 Genotipagem pelo RAPD-PCR

Após identificadas como *S.mutans*, 15 amostras por coleta (A), (B) e (C) de cada voluntário foram selecionadas para serem genotipadas por RAPD-PCR. Após a reação de RAPD-PCR e separação dos amplicons em gel de agarose a 2%, foi realizada a análise da variabilidade clonal das amostras, através da comparação visual das fotografias dos géis obtidos em cada coleta (Figuras 5.4, 5.5 e 5.6) e confirmadas pelo programa de computador Gene-Tools.

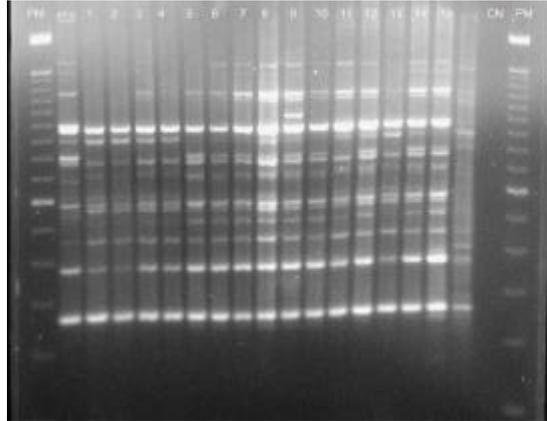


Figura 5.4 – Fotografia de gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, em tampão TAE, mostrando produtos de RAPD-PCR de 15 amostras obtidas na coleta (A), para o voluntário T10. PM= peso molecular (100 bp ladder, Invitrogen); CP (ATCC 25175); CN (controle negativo); 1 a 15 isolados salivares

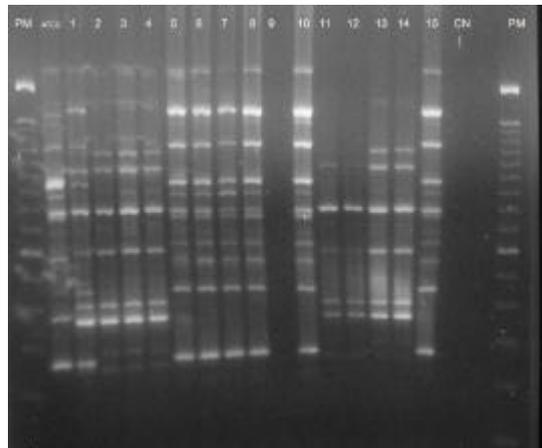


Figura 5.5 – Fotografia de gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, em tampão TAE, mostrando produtos de RAPD-PCR de 14 amostras obtidas na coleta (B), para o voluntário T10. PM = peso molecular (100 bp ladder, Invitrogen); ATCC (controle positivo); CN (controle negativo); 1 a 15 isolados salivares

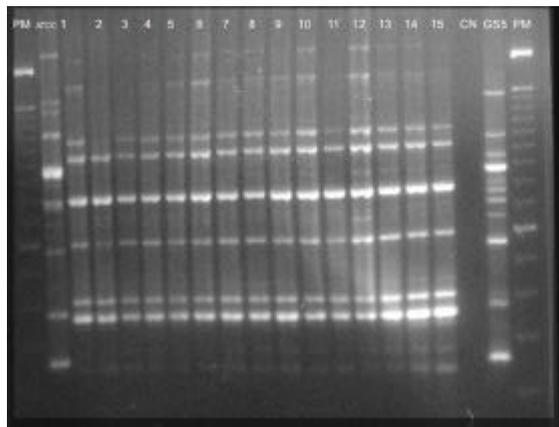


Figura 5.6 – Fotografia de gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, em tampão TAE, mostrando produtos de RAPD-PCR de 15 amostras obtidas na coleta (C), para o voluntário T10. PM = peso molecular (100 bp ladder, Invitrogen); ATCC e GS-5 (controle positivo); CN (controle negativo); 1 a 15 isolados salivares

Após a análise individual do perfil das bandas obtidas com amostras de cada paciente, foi realizada nova reação de RAPD-PCR e corrida eletroforética em gel de agarose 2%, para amostras representativas de cada genótipo nas 3 etapas experimentais (Figuras 5.7 e 5.8), para confirmação do número de genótipos identificados na análise comparativa.

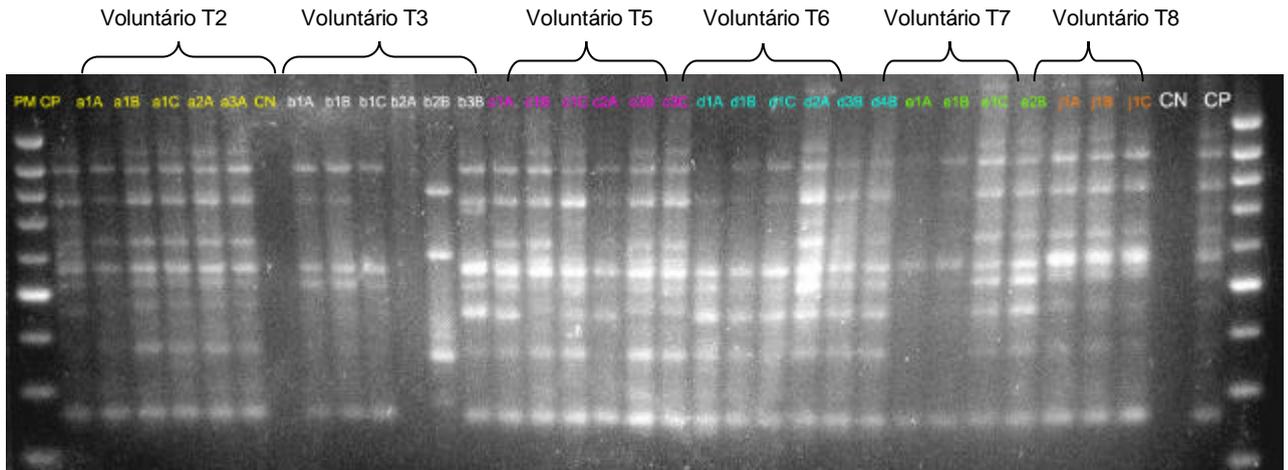


Figura 5.7 – Fotografia do gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, em tampão TAE, onde produtos provenientes da reação de RAPD-PCR representam os genótipos encontrados no mesmo indivíduo (cores iguais), nas coletas (A), (B) e (C), para 6 voluntários. CN (controle negativo); CP (controle positivo ATCC 25175)

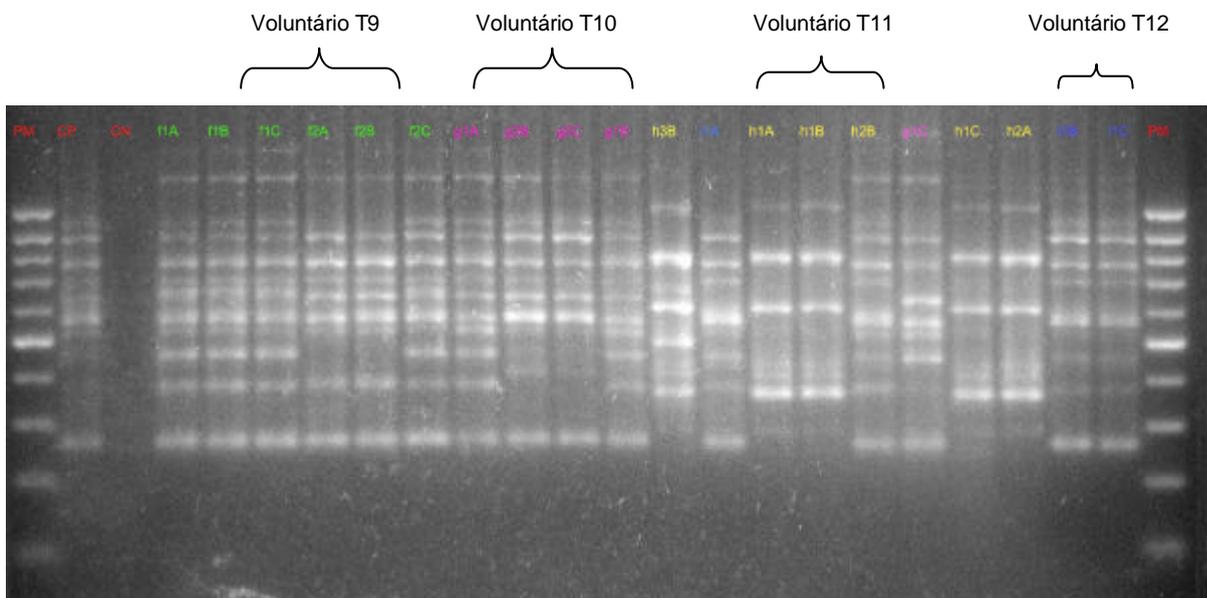


Figura 5.8 - Fotografia do gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, em tampão TAE onde produtos provenientes da reação de RAPD-PCR representam os genótipos encontrados no mesmo indivíduo (cores iguais), nas 3 coletas (A), (B) e (C), para os outros 4 voluntários. CP (controle positivo ATCC 25175); CN (controle negativo)

Entre as amostras de *S.mutans* oriundas dos 10 voluntários, avaliadas nas 3 etapas experimentais, foram identificados 17 genótipos distintos no total, correspondendo à média de 1,7 genótipos por voluntário. Os números mínimo e máximo de genótipos por indivíduo foram 1 e 3, respectivamente.

A distribuição dos genótipos encontrados, suas frequências e porcentagens em cada paciente, para cada uma das etapas experimentais são apresentados na tabela 5.3. Em 3 dos 10 voluntários examinados, houve distinção de 1 genótipo na coleta (B) diferente daqueles detectados em (A). No entanto, em 2 dos 3 voluntários, os genótipos emergentes na coleta B (b3, g2 e h3), não foram detectados na coleta C (b3 e h3). A frequência na emergência de genótipos diferentes após a utilização de goma de mascar contendo xilitol foi muito baixa, sendo os valores considerados pequenos para aplicação de testes ou análises estatísticas. Em 4 dos 10 voluntários, um dos genótipos (b2, d2, f2 e h2), igualmente detectado nas coletas (A) e (B), não foi novamente identificado na coleta (C).

Embora o nível de SM salivar nos voluntários tenha diminuído entre a primeira e a segunda coleta, após o uso da goma com xilitol, os genótipos que se apresentaram mais prevalentes na primeira coleta, em geral, mantiveram sua proporção nas demais coletas, mesmo com as variações apresentadas.

Tabela 5.3 – Número de genótipos de *S.mutans* detectado por voluntário nas 3 etapas experimentais, antes do uso de goma de mascar com 15% de xilitol (A), 30 dias após o consumo (B) e 30 dias após interrupção de seu uso (C). A frequência de detecção de cada genótipo é dada sobre o total de amostras analisadas por voluntário, por etapa. As colunas com o símbolo “%” indicam a porcentagem da frequência de detecção de cada genótipo para a respectiva coluna à esquerda

Voluntário	Total de Genótipos por voluntário	Genótipos	Frequência de cada genótipo nas etapas experimentais					
			A	%	B	%	C	%
T2*	1	a1*	15/15	100	15/15*	100	15/15	100
T3*	3	b1	14/15	93,3	10/15	66,7	15/15	100
		b2*	1/15*	6,7	1/15*	6,7		
		b3			4/15	26,7		
T5*	1	c1*	15/15*	100	15/15	100	15/15	100
T6	2	d1	12/15	80	13/15	86,7	15/15	100
		d2	3/15	20	2/15	13,3		
T7	1	e1	15/15	100	15/15	100	15/15	100
T8	2	f1	14/15	93,3	14/15	93,3	14/14	100
		f2	1/15	6,7	1/15	6,7		
T9*	2	g1	14/14	100	12/15	80	11/15	73,3
		g2*			3/15*	20	4/15	26,7
T10*	3	h1*	9/15	60	6/14	42,9	15/15*	100
		h2	6/15	40	7/14	50		
		h3*			1/14*	7,1		
T11	1	i1	15/15	100	15/15	100	15/15	100
T12	1	j1	15/15	100	15/15	100	15/15	100

* presença de amostra xilitol-tolerante

5.4 Análise da tolerância ao xilitol

A análise da tolerância *in vitro* ao xilitol foi realizada para identificar a possível ocorrência de seleção *in vivo* de cepas xilitol-tolerantes.

O estudo das amostras de *S.mutans* selecionadas, com a finalidade de observar a possível tolerância ao xilitol, foi realizado através da obtenção das curvas de crescimento para cada amostra, em meio BHI contendo 1% de xilitol, medidas durante 16 horas e comparadas com as curvas obtidas para cada amostra na ausência do poliálcool, no mesmo meio de cultura. As curvas de crescimento obtidas por amostra também foram comparadas com curvas obtidas para a amostra-padrão xilitol-sensível (utilizada como controle negativo, representada pela cepa padrão UA159) e amostra-padrão xilitol-tolerante (utilizada como controle positivo, representada pela cepa TW17).

Das 124 cepas estudadas com relação à tolerância ao xilitol (no máximo 3 representantes de cada genótipo por etapa), apenas 12 amostras apresentaram valores de densidade óptica, após 4 a 16 horas de incubação, semelhantes, tanto em meio de cultura BHI, quanto em BHI acrescido de 1% de xilitol. Isto indica que estas amostras não tiveram seu crescimento afetado pela presença do poliálcool no meio, sendo, portanto, consideradas xilitol-tolerantes. A média dos valores para as medidas de absorbâncias, obtidas através de leitura óptica, a 450 nm, obtidas no experimento realizado em triplicata, para as culturas de amostras consideradas xilitol-tolerantes estão apresentados na tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Valores médios de Abs_{450 nm} obtidos a partir da leitura de densidade óptica das culturas de diferentes amostras de *S. mutans* incubadas por 16 horas, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, em meios BHI (G) e BHI/xilitol 1% (X) para cepas consideradas xilitol-tolerantes, entre 124 amostras avaliadas nas coletas (A), (B) e (C) e seus respectivos valores para os controles negativo (UA 159) e controle positivo (TW 17)

Amostra	BHI	0h	2h	4h	8h	12h	16h
UA159	G	0,058	0,119	0,557	0,748	0,753	0,785
	X	0,057	0,117	0,388	0,565	0,566	0,535
TW17	G	0,058	0,129	0,577	0,818	0,764	0,776
	X	0,057	0,125	0,563	0,782	0,745	0,761
T2B31	G	0,026	0,073	0,444	0,700	0,680	0,567
	X	0,032	0,078	0,433	0,621	0,608	0,521
UA159	G	0,058	0,119	0,557	0,748	0,753	0,785
	X	0,057	0,117	0,388	0,565	0,566	0,535
TW17	G	0,058	0,129	0,577	0,818	0,764	0,776
	X	0,057	0,125	0,563	0,782	0,745	0,761
T3A21	G	0,040	0,067	0,410	0,697	0,695	0,696
	X	0,050	0,079	0,425	0,595	0,605	0,607
T3B24	G	0,030	0,079	0,421	0,582	0,606	0,643
	X	0,045	0,103	0,450	0,491	0,510	0,563
UA159	G	0,040	0,131	0,463	0,791	0,753	0,750
	X	0,048	0,133	0,380	0,596	0,592	0,562
TW17	G	0,049	0,108	0,504	0,811	0,746	0,730
	X	0,059	0,107	0,493	0,792	0,735	0,746
T5A47	G	0,036	0,056	0,282	0,634	0,622	0,620
	X	0,044	0,060	0,287	0,640	0,601	0,603
T5A2	G	0,039	0,066	0,384	0,672	0,624	0,622
	X	0,044	0,064	0,387	0,644	0,586	0,589
T5A16	G	0,030	0,054	0,280	0,617	0,594	0,601
	X	0,035	0,050	0,289	0,606	0,581	0,584
T5A61	G	0,029	0,076	0,379	0,668	0,671	0,684
	X	0,045	0,084	0,411	0,677	0,639	0,643
UA159	G	0,048	0,148	0,550	0,882	0,883	0,857
	X	0,047	0,143	0,399	0,620	0,631	0,584
TW17	G	0,047	0,130	0,499	0,861	0,874	0,836
	X	0,043	0,124	0,472	0,765	0,784	0,756
T9B36	G	0,036	0,131	0,557	0,832	0,814	0,811
	X	0,039	0,142	0,453	0,748	0,719	0,708
UA159	G	0,055	0,172	0,471	0,889	0,896	0,854
	X	0,050	0,145	0,361	0,583	0,613	0,567
TW 17	G	0,044	0,141	0,365	0,868	0,877	0,850
	X	0,043	0,136	0,346	0,832	0,817	0,750
T10B1	G	0,015	0,049	0,138	0,604	0,655	0,654
	X	0,014	0,048	0,156	0,539	0,575	0,572
T10C37	G	0,021	0,057	0,200	0,666	0,699	0,682
	X	0,027	0,045	0,227	0,537	0,550	0,521
T10C49	G	0,021	0,046	0,147	0,623	0,607	0,620
	X	0,022	0,058	0,196	0,517	0,530	0,504
T10C52	G	0,017	0,047	0,147	0,588	0,616	0,588
	X	0,017	0,052	0,156	0,503	0,507	0,497

Os valores de absorvência foram considerados semelhantes para uma mesma amostra, quando a diferença entre a média obtida em meio BHI e em BHI acrescido de xilitol a 1%, não foi superior a uma casa decimal (0,1), a partir da leitura de 4 horas em diante. Este valor foi aleatoriamente determinado pela comparação entre as médias apresentadas pela cepa padrão utilizada como controle positivo (TW17). Uma vez que essa foi a máxima variação encontrada nas médias obtidas para os valores de absorvência na cepa TW17, todas as amostras estudadas, que apresentaram tal variação, também foram admitidas como tendo o comportamento da cepa padrão, ou seja, xilitol-tolerante.

As 12 amostras xilitol-tolerantes foram isoladas de 5 indivíduos (T2, T3, T5, T9, T10), dados que também são apresentados na tabela 5.3. Os resultados mostram que os voluntários T3 e T5 apresentaram essas amostras na coleta (A), anterior ao consumo de xilitol. No voluntário T3 essa amostra tolerante também foi detectada na coleta (B), sendo correspondente ao mesmo genótipo *b2*, em ambas as coletas. Para o voluntário T5 as amostras consideradas tolerantes só foram detectadas na coleta (A), sendo que as amostras das coletas (B) e (C) deste voluntário só se apresentaram como sensíveis. Entretanto, neste indivíduo, o mesmo genótipo *c1* apresentou as 2 variáveis fenotípicas, sensível e tolerante (X^S e X^R), uma vez que foi o único genótipo identificado.

Os demais voluntários não apresentaram amostras xilitol-tolerantes no exame inicial. Entretanto, após o uso da goma com xilitol (B), 3 voluntários (T2, T9 e T10) apresentaram amostras X^R . Todavia, amostras X^R não foram detectadas nos voluntários T2 e T9 na coleta (C). Para o voluntário T2, foi

detectada na coleta (B) uma amostra X^R , representante do genótipo $a1$. Amostras X^S deste mesmo genótipo $a1$ também foram identificadas nas coletas (A), (B) e (C), uma vez que este foi o único genótipo detectado neste voluntário. Para o indivíduo T9 a amostra X^R encontrada na coleta (B) foi representante do genótipo $g2$. Este genótipo não havia sido identificado na coleta (A). No entanto, após o uso da goma de mascar, este genótipo foi detectado nas coletas (B) e (C), porém em menor prevalência do que o genótipo $g1$. Contudo, embora na coleta (C), o genótipo $g2$ tenha continuado a ser detectado, não foram selecionadas cepas X^R para nenhum dos 2 genótipos apresentados por este indivíduo.

No indivíduo T10, haviam sido identificados 2 genótipos na coleta A ($h1$ e $h2$). Após o uso do xilitol, 3 tipos genotípicos diferentes entre si puderam ser detectados ($h1$, $h2$ e $h3$). Ocorreu a detecção de amostra tolerante X^R na coleta (B), porém esta foi representante do genótipo $h3$, que foi detectado somente na coleta (B). Este foi o único indivíduo cuja detecção de cepas X^R continuou ocorrendo na coleta (C), sendo que as amostras X^R identificadas na coleta (C) foram representantes do genótipo $h1$. O genótipo $h3$, detectado na coleta (B), assim como o genótipo $h2$, que esteve presente nas coletas (A) e (B) não foram identificados na coleta (C) para este voluntário.

Os gráficos exemplificando as curvas de crescimento obtidas pelas médias dos valores de absorbância, medidos para as culturas em triplicata, nos instantes 0, 2, 4, 8, 12 e 16 horas de incubação, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO_2 , de amostra considerada sensível (X^S) e tolerante (X^R) são apresentados nas figuras 5.9 e 5.10.

Para os outros 5 voluntários (T6, T7, T8, T11 e T12), todas as amostras estudadas, representantes das 3 etapas experimentais, foram consideradas sensíveis com relação à tolerância ao xilitol.

Os valores representando as médias das leituras da densidade óptica nas culturas em triplicata, ($Abs_{450\text{ nm}}$) para todas amostras de *S.mutans* estudadas com relação à tolerância ao xilitol, em meio BHI e BHI / xilitol 1%, representativas dos diferentes genótipos encontrados em todos os voluntários, são apresentados nas tabelas 5.5 à 5.14.

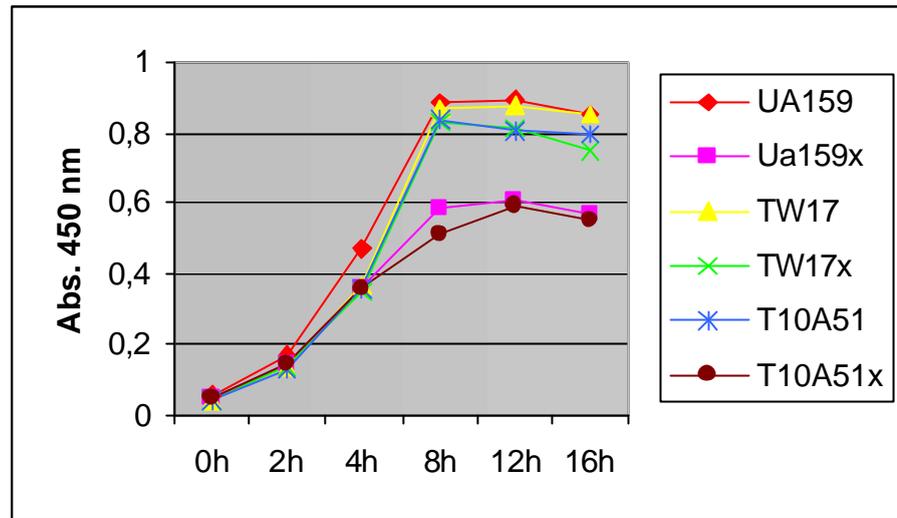


Figura 5.9 – Média dos valores obtidos para as medidas de absorvância nas culturas de amostras de *S. mutans* incubadas por 16 horas, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. O gráfico representa as curvas de crescimento formadas pela média dos valores obtidos em triplicata nos meios BHI e BHI/xilitol 1% (letra "x") em cada momento medido. Controle positivo (TW17), controle negativo (UA159) e amostra T10A51, representativa do genótipo *h1*, fenótipo X^S para o voluntário T10

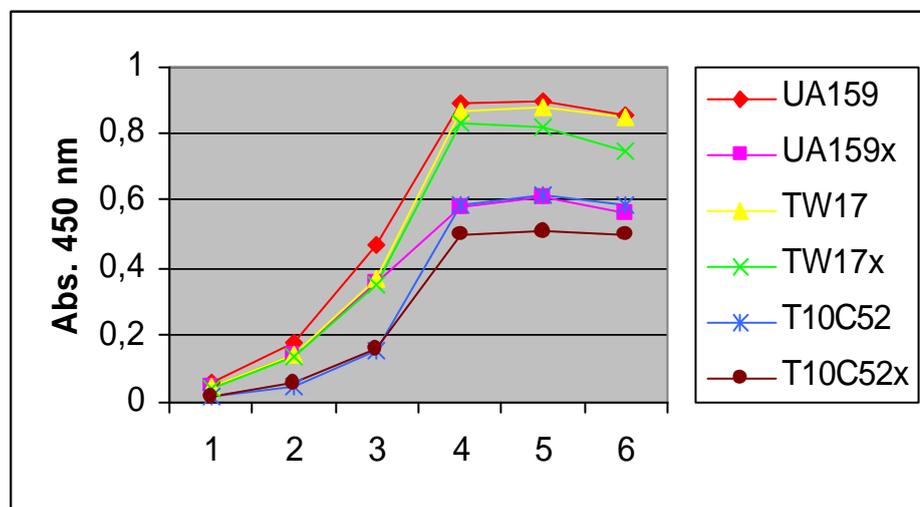


Figura 5.10 – Média dos valores obtidos para as medidas de absorvância nas culturas de amostras de *S. mutans* incubadas por 16 horas, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. O gráfico representa as curvas de crescimento formadas pela média dos valores obtidos em triplicata nos meios BHI e BHI/xilitol 1% (letra "x") em cada momento medido. Controle positivo (TW17), controle negativo (UA159) e amostra T10C52, representativa do genótipo *h1*, fenótipo X^R para o voluntário T10

Tabela 5.5 - Valores médios de Abs_{450 nm} obtidos a partir da leitura de densidade óptica das culturas das amostras de *S.mutans* estudadas com relação à tolerância ao xilitol para o voluntário T2, incubadas por 16 horas, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, em meios BHI (G) e BHI/xilitol 1% (X) avaliadas nas coletas (A), (B) e (C) e seus respectivos valores para os controles negativo (UA 159) e controle positivo (TW 17)

Amostra	BHI	0h	2h	4h	8h	12h	16h
UA159	G	0,043	0,130	0,634	0,740	0,715	0,737
	X	0,052	0,136	0,421	0,577	0,550	0,510
TW17	G	0,035	0,124	0,624	0,807	0,715	0,726
	X	0,045	0,132	0,646	0,771	0,718	0,719
T2A38	G	0,020	0,079	0,429	0,648	0,637	0,663
	X	0,027	0,071	0,329	0,468	0,459	0,440
T2A54	G	0,026	0,086	0,434	0,674	0,665	0,653
	X	0,037	0,083	0,307	0,455	0,463	0,427
T2A39	G	0,030	0,069	0,470	0,713	0,680	0,620
	X	0,035	0,075	0,305	0,443	0,436	0,404
T2A32	G	0,021	0,068	0,389	0,615	0,609	0,599
	X	0,029	0,068	0,280	0,391	0,405	0,388
T2B1	G	0,025	0,069	0,376	0,642	0,627	0,569
	X	0,036	0,075	0,308	0,417	0,436	0,409
T2B66	G	0,020	0,067	0,410	0,634	0,622	0,589
	X	0,023	0,061	0,263	0,383	0,386	0,361
T2B32	G	0,023	0,062	0,392	0,642	0,646	0,537
	X	0,021	0,064	0,279	0,348	0,423	0,387
T2B31	G	0,026	0,073	0,444	0,700	0,680	0,567
	X	0,032	0,078	0,433	0,621	0,608	0,521
T2C30	G	0,021	0,076	0,477	0,677	0,651	0,616
	X	0,037	0,079	0,310	0,440	0,425	0,411
T2C27	G	0,020	0,048	0,358	0,622	0,620	0,503
	X	0,026	0,048	0,260	0,377	0,399	0,364
T2C24	G	0,028	0,720	0,480	0,686	0,655	0,635
	X	0,032	0,083	0,313	0,428	0,391	0,397

Tabela 5.6 – Valores médios de Abs_{450 nm} obtidos a partir da leitura de densidade óptica das culturas das amostras de *S.mutans*, estudadas com relação à tolerância ao xilitol para o voluntário T3, incubadas por 16 horas, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, em meios BHI (G) e BHI/xilitol 1% (X), avaliadas nas coletas (A), (B) e (C) e seus respectivos valores para os controles negativo (UA 159) e controle positivo (TW 17)

Amostra	BHI	0h	2h	4h	8h	12h	16h
UA159	G	0,058	0,119	0,557	0,748	0,753	0,785
	X	0,057	0,117	0,388	0,565	0,566	0,535
TW17	G	0,058	0,129	0,577	0,818	0,764	0,776
	X	0,057	0,125	0,563	0,782	0,745	0,761
T3A81	G	0,046	0,120	0,561	0,704	0,701	0,735
	X	0,053	0,112	0,350	0,468	0,465	0,470
T3A19	G	0,043	0,095	0,423	0,660	0,667	0,679
	X	0,052	0,099	0,334	0,456	0,456	0,468
T3A21	G	0,040	0,067	0,410	0,697	0,695	0,696
	X	0,050	0,079	0,425	0,595	0,605	0,607
T3A88	G	0,033	0,095	0,436	0,641	0,650	0,689
	X	0,043	0,093	0,311	0,435	0,427	0,438
T3B18	G	0,028	0,042	0,176	0,545	0,546	0,542
	X	0,040	0,051	0,183	0,420	0,457	0,454
T3B41	G	0,028	0,095	0,478	0,664	0,675	0,719
	X	0,043	0,095	0,320	0,437	0,425	0,450
T3B24	G	0,030	0,079	0,421	0,582	0,606	0,643
	X	0,045	0,103	0,450	0,491	0,510	0,563
T3B37	G	0,039	0,085	0,428	0,604	0,617	0,603
	X	0,048	0,094	0,325	0,419	0,408	0,432
T3B11	G	0,033	0,083	0,449	0,672	0,703	0,757
	X	0,042	0,079	0,300	0,383	0,387	0,415
T3B33	G	0,034	0,033	0,142	0,595	0,581	0,585
	X	0,034	0,310	0,140	0,372	0,436	0,453
T3B72	G	0,035	0,060	0,189	0,601	0,545	0,525
	X	0,029	0,048	0,135	0,453	0,425	0,411
T3C1	G	0,027	0,075	0,468	0,621	0,662	0,705
	X	0,038	0,090	0,316	0,378	0,383	0,419
T3C43	G	0,027	0,061	0,341	0,596	0,581	0,610
	X	0,043	0,090	0,333	0,420	0,413	0,446
T3C39	G	0,027	0,042	0,318	0,643	0,670	0,633
	X	0,030	0,047	0,266	0,322	0,383	0,424

Tabela 5.7 - Valores médios de Abs_{450 nm} obtidos a partir da leitura de densidade óptica das culturas das amostras de *S.mutans*, estudadas com relação à tolerância ao xilitol, para o voluntário T5, incubadas por 16 horas, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, em meios BHI (G) e BHI/xilitol 1% (X) avaliadas nas coletas (A), (B) e (C) e seus respectivos valores para os controles negativo (UA 159) e controle positivo (TW 17)

Amostra	BHI	0h	2h	4h	8h	12h	16h
UA159	G	0,040	0,131	0,463	0,791	0,753	0,750
	X	0,048	0,133	0,380	0,596	0,592	0,562
TW17	G	0,049	0,108	0,504	0,811	0,746	0,730
	X	0,059	0,107	0,493	0,792	0,735	0,746
T5A61	G	0,029	0,076	0,379	0,668	0,671	0,684
	X	0,045	0,084	0,411	0,677	0,639	0,643
T5A47	G	0,036	0,056	0,282	0,634	0,622	0,620
	X	0,044	0,060	0,287	0,640	0,601	0,603
T5A2	G	0,039	0,066	0,384	0,672	0,624	0,622
	X	0,044	0,064	0,387	0,644	0,586	0,589
T5A16	G	0,030	0,054	0,280	0,617	0,594	0,601
	X	0,045	0,050	0,289	0,606	0,581	0,584
T5B17	G	0,029	0,041	0,290	0,633	0,591	0,572
	X	0,039	0,041	0,264	0,354	0,425	0,418
T5B14	G	0,025	0,030	0,253	0,524	0,511	0,517
	X	0,028	0,031	0,213	0,397	0,427	0,419
T5B13	G	0,027	0,022	0,245	0,577	0,545	0,548
	X	0,034	0,023	0,215	0,365	0,456	0,443
T5B4	G	0,028	0,022	0,206	0,443	0,459	0,471
	X	0,034	0,022	0,181	0,295	0,350	0,361
T5B19	G	0,023	0,020	0,297	0,589	0,549	0,557
	X	0,031	0,022	0,252	0,351	0,421	0,416
T5B18	G	0,022	0,017	0,262	0,515	0,493	0,489
	X	0,034	0,032	0,222	0,382	0,423	0,414
T5C27	G	0,026	0,021	0,241	0,582	0,540	0,548
	X	0,033	0,024	0,213	0,384	0,423	0,418
T5C17	G	0,025	0,019	0,234	0,530	0,495	0,502
	X	0,032	0,022	0,205	0,379	0,426	0,416
T5C8	G	0,032	0,240	0,295	0,582	0,518	0,515
	X	0,039	0,340	0,250	0,410	0,439	0,427

Tabela 5.8 - Valores médios de Abs_{450 nm} obtidos a partir da leitura de densidade óptica das culturas das amostras de *S.mutans*, estudadas com relação à tolerância ao xilitol, para o voluntário T6, incubadas por 16 horas, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, em meios BHI (G) e BHI/xilitol 1% (X) avaliadas nas coletas (A), (B) e (C) e seus respectivos valores para os controles negativo (UA 159) e controle positivo (TW 17)

Amostra	BHI	0h	2h	4h	8h	12h	16h
UA159	G	0,059	0,153	0,553	0,805	0,776	0,781
	X	0,055	0,128	0,362	0,547	0,572	0,534
TW17	G	0,052	0,122	0,440	0,778	0,700	0,722
	X	0,052	0,116	0,415	0,766	0,710	0,721
T6A35	G	0,045	0,110	0,435	0,657	0,614	0,602
	X	0,043	0,092	0,274	0,393	0,462	0,421
T6A23	G	0,041	0,105	0,404	0,646	0,606	0,596
	X	0,045	0,096	0,279	0,404	0,478	0,438
T6A32	G	0,045	0,113	0,429	0,700	0,670	0,669
	X	0,053	0,102	0,277	0,403	0,499	0,455
T6A27	G	0,047	0,103	0,387	0,605	0,590	0,587
	X	0,045	0,101	0,278	0,422	0,490	0,454
T6A24	G	0,032	0,083	0,348	0,625	0,602	0,598
	X	0,039	0,084	0,257	0,363	0,445	0,409
T6A21	G	0,040	0,080	0,327	0,610	0,552	0,564
	X	0,042	0,082	0,264	0,379	0,487	0,442
T6B34	G	0,037	0,096	0,393	0,608	0,575	0,540
	X	0,044	0,096	0,270	0,376	0,475	0,422
T6B70	G	0,034	0,087	0,396	0,650	0,635	0,632
	X	0,041	0,087	0,251	0,351	0,425	0,384
T6B6	G	0,036	0,071	0,331	0,603	0,534	0,508
	X	0,041	0,080	0,260	0,354	0,456	0,412
T6B56	G	0,038	0,085	0,403	0,622	0,604	0,601
	X	0,040	0,075	0,264	0,367	0,456	0,406
T6B8	G	0,034	0,074	0,360	0,593	0,579	0,544
	X	0,039	0,070	0,251	0,347	0,461	0,412
T6C24	G	0,035	0,078	0,392	0,588	0,548	0,499
	X	0,036	0,069	0,268	0,373	0,463	0,412
T6C58	G	0,040	0,089	0,430	0,659	0,617	0,628
	X	0,046	0,101	0,280	0,403	0,490	0,439
T6C37	G	0,038	0,078	0,391	0,564	0,523	0,492
	X	0,042	0,084	0,257	0,371	0,457	0,408

Tabela 5.9 - Valores médios de $Abs_{450\text{ nm}}$ obtidos a partir da leitura de densidade óptica das culturas das amostras de *S.mutans*, estudadas com relação à tolerância ao xilitol, para o voluntário T7, incubadas por 16 horas, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, em meios BHI (G) e BHI/xilitol 1% (X) avaliadas nas coletas (A), (B) e (C) e seus respectivos valores para os controles negativo (UA 159) e controle positivo (TW 17)

Amostra	BHI	0h	2h	4h	8h	12h	16h
UA159	G	0,056	0,126	0,502	0,767	0,736	0,711
	X	0,060	0,126	0,372	0,561	0,589	0,527
TW17	G	0,057	0,143	0,532	0,823	0,762	0,709
	X	0,057	0,127	0,473	0,777	0,737	0,713
T7A38	G	0,033	0,087	0,369	0,662	0,657	0,645
	X	0,049	0,103	0,336	0,506	0,441	0,465
T7A17	G	0,044	0,095	0,388	0,699	0,721	0,706
	X	0,052	0,103	0,339	0,445	0,459	0,429
T7A23	G	0,036	0,084	0,364	0,671	0,668	0,644
	X	0,043	0,081	0,306	0,454	0,473	0,443
T7B14	G	0,044	0,094	0,383	0,670	0,673	0,628
	X	0,049	0,094	0,303	0,477	0,531	0,457
T7B21	G	0,036	0,085	0,387	0,679	0,689	0,664
	X	0,047	0,900	0,337	0,467	0,492	0,446
T7B8	G	0,037	0,088	0,385	0,669	0,674	0,625
	X	0,051	0,101	0,335	0,472	0,504	0,460
T7B11	G	0,041	0,078	0,382	0,676	0,686	0,659
	X	0,049	0,083	0,333	0,444	0,468	0,414
T7C17	G	0,031	0,063	0,340	0,652	0,660	0,615
	X	0,034	0,060	0,258	0,388	0,433	0,387
T7C11	G	0,045	0,084	0,427	0,699	0,716	0,684
	X	0,045	0,095	0,346	0,470	0,486	0,421
T7C10	G	0,046	0,900	0,441	0,677	0,683	0,647
	X	0,048	0,103	0,360	0,460	0,478	0,429

Tabela 5.10 - Valores médios de Abs_{450 nm} obtidos a partir da leitura de densidade óptica das culturas das amostras de *S.mutans*, estudadas com relação à tolerância ao xilitol, para o voluntário T8, incubadas por 16 horas, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, em meios BHI (G) e BHI/xilitol 1% (X) avaliadas nas coletas (A), (B) e (C) e seus respectivos valores para os controles negativo (UA 159) e controle positivo (TW 17)

Amostra	BHI	0h	2h	4h	8h	12h	16h
UA159	G	0,037	0,108	0,425	0,796	0,801	0,803
	X	0,040	0,118	0,337	0,538	0,557	0,521
TW17	G	0,039	0,110	0,412	0,774	0,773	0,768
	X	0,041	0,123	0,452	0,713	0,716	0,648
T8A53	G	0,048	0,137	0,443	0,786	0,771	0,753
	X	0,038	0,115	0,293	0,535	0,526	0,513
T8A8	G	0,043	0,133	0,410	0,806	0,762	0,708
	X	0,036	0,112	0,287	0,444	0,451	0,470
T8A12	G	0,046	0,127	0,423	0,804	0,794	0,765
	X	0,043	0,116	0,318	0,537	0,514	0,500
T8A16	G	0,037	0,111	0,358	0,700	0,696	0,675
	X	0,034	0,103	0,273	0,497	0,489	0,469
T8B52	G	0,041	0,114	0,420	0,777	0,762	0,729
	X	0,036	0,099	0,286	0,500	0,492	0,462
T8B5	G	0,044	0,114	0,393	0,794	0,791	0,759
	X	0,042	0,107	0,297	0,530	0,526	0,492
T8B81	G	0,040	0,090	0,181	0,779	0,777	0,736
	X	0,035	0,083	0,236	0,373	0,424	0,425
T8C69	G	0,045	0,120	0,330	0,762	0,760	0,727
	X	0,045	0,085	0,259	0,495	0,496	0,470
T8C19	G	0,025	0,058	0,218	0,693	0,729	0,696
	X	0,026	0,056	0,196	0,448	0,487	0,460
T8C68	G	0,027	0,059	0,176	0,730	0,738	0,697
	X	0,019	0,035	0,156	0,445	0,473	0,443
T8C73	G	0,036	0,098	0,374	0,792	0,770	0,725
	X	0,034	0,089	0,269	0,424	0,438	0,459
T8C9	G	0,030	0,070	0,277	0,780	0,778	0,735
	X	0,024	0,060	0,229	0,489	0,489	0,451

Tabela 5.11 - Valores médios de Abs_{450 nm} obtidos a partir da leitura de densidade óptica das culturas das amostras de *S.mutans*, estudadas com relação à tolerância ao xilitol, para o voluntário T9, incubadas por 16 horas, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, em meios BHI (G) e BHI/xilitol 1% (X) avaliadas nas coletas (A), (B) e (C) e seus respectivos valores para os controles negativo (UA 159) e controle positivo (TW 17)

Amostra	BHI	0h	2h	4h	8h	12h	16h
UA159	G	0,048	0,148	0,550	0,882	0,883	0,857
	X	0,047	0,143	0,399	0,620	0,631	0,584
TW17	G	0,047	0,130	0,499	0,861	0,874	0,836
	X	0,043	0,124	0,472	0,765	0,784	0,756
T9A22	G	0,040	0,092	0,352	0,671	0,664	0,658
	X	0,044	0,106	0,302	0,528	0,522	0,497
T9A16	G	0,037	0,088	0,342	0,701	0,635	0,635
	X	0,035	0,092	0,313	0,525	0,536	0,518
T9A20	G	0,024	0,075	0,293	0,663	0,662	0,645
	X	0,033	0,087	0,276	0,464	0,489	0,475
T9B36	G	0,036	0,131	0,557	0,832	0,814	0,811
	X	0,039	0,142	0,453	0,748	0,719	0,708
T9B76	G	0,020	0,071	0,293	0,635	0,591	0,553
	X	0,033	0,084	0,260	0,432	0,484	0,459
T9B84	G	0,022	0,100	0,368	0,700	0,680	0,651
	X	0,035	0,111	0,340	0,543	0,546	0,510
T9B30	G	0,027	0,061	0,183	0,620	0,641	0,626
	X	0,023	0,050	0,146	0,328	0,402	0,396
T9B71	G	0,035	0,125	0,523	0,694	0,712	0,709
	X	0,031	0,116	0,532	0,550	0,577	0,566
T9B75	G	0,036	0,128	0,546	0,682	0,701	0,692
	X	0,031	0,114	0,512	0,556	0,475	0,571
T9B60	G	0,039	0,118	0,541	0,740	0,768	0,771
	X	0,025	0,094	0,479	0,497	0,519	0,517
T9C44	G	0,030	0,103	0,588	0,700	0,712	0,713
	X	0,030	0,105	0,498	0,585	0,604	0,609
T9C30	G	0,033	0,055	0,268	0,745	0,726	0,683
	X	0,031	0,053	0,218	0,432	0,491	0,459
T9C33	G	0,034	0,053	0,275	0,700	0,701	0,662
	X	0,034	0,058	0,244	0,434	0,475	0,464
T9C59	G	0,025	0,089	0,400	0,762	0,756	0,725
	X	0,025	0,096	0,317	0,526	0,489	0,486
T9C56	G	0,023	0,095	0,405	0,718	0,677	0,654
	X	0,027	0,096	0,316	0,539	0,534	0,520

Tabela 5.12 - Valores médios de Abs_{450 nm} obtidos a partir da leitura de densidade óptica das culturas das amostras de *S.mutans*, estudadas com relação à tolerância ao xilitol, para o voluntário T10, incubadas por 16 horas, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, em meios BHI (G) e BHI/xilitol 1% (X) avaliadas nas coletas (A), (B) e (C) e seus respectivos valores para os controles negativo (UA 159) e controle positivo (TW 17)

Amostra	BHI	0h	2h	4h	8h	12h	16h
UA159	G	0,055	0,172	0,471	0,889	0,896	0,854
	X	0,050	0,145	0,361	0,583	0,613	0,567
TW17	G	0,044	0,141	0,365	0,868	0,877	0,850
	X	0,043	0,136	0,346	0,832	0,817	0,750
T10A2	G	0,044	0,133	0,350	0,823	0,798	0,773
	X	0,041	0,126	0,320	0,502	0,555	0,522
T10A3	G	0,042	0,119	0,335	0,853	0,832	0,810
	X	0,034	0,102	0,280	0,490	0,545	0,511
T10A52	G	0,043	0,117	0,281	0,835	0,813	0,791
	X	0,041	0,107	0,253	0,480	0,559	0,526
T10A51	G	0,043	0,130	0,356	0,835	0,802	0,797
	X	0,045	0,146	0,357	0,512	0,590	0,553
T10A41	G	0,040	0,105	0,279	0,664	0,805	0,781
	X	0,040	0,097	0,280	0,515	0,551	0,520
T10A54	G	0,040	0,109	0,203	0,884	0,854	0,839
	X	0,038	0,084	0,202	0,520	0,508	0,474
T10B4	G	0,030	0,086	0,203	0,780	0,691	0,665
	X	0,024	0,080	0,202	0,523	0,536	0,506
T10B34	G	0,028	0,069	0,159	0,664	0,700	0,654
	X	0,024	0,063	0,154	0,515	0,538	0,505
T10B60	G	0,036	0,088	0,268	0,884	0,829	0,797
	X	0,028	0,075	0,223	0,520	0,595	0,531
T10B13	G	0,027	0,093	0,275	0,780	0,733	0,705
	X	0,021	0,079	0,233	0,523	0,588	0,523
T10B16	G	0,025	0,085	0,289	0,835	0,828	0,796
	X	0,021	0,075	0,237	0,533	0,593	0,522
T10B19	G	0,100	0,296	0,721	0,806	0,775	0,734
	X	0,124	0,298	0,481	0,664	0,642	0,565
T10B1	G	0,015	0,049	0,138	0,604	0,655	0,654
	X	0,014	0,048	0,156	0,539	0,575	0,572
T10C37	G	0,021	0,057	0,200	0,666	0,699	0,682
	X	0,027	0,045	0,227	0,537	0,550	0,521
T10C49	G	0,021	0,046	0,147	0,623	0,607	0,620
	X	0,022	0,058	0,196	0,517	0,530	0,504
T10C52	G	0,017	0,047	0,147	0,588	0,616	0,588
	X	0,017	0,052	0,156	0,503	0,507	0,497

Tabela 5.13 - Valores médios de Abs_{450 nm} obtidos a partir da leitura de densidade óptica das culturas das amostras de *S. mutans*, estudadas com relação à tolerância ao xilitol, para o voluntário T11, incubadas por 16 horas, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, em meios BHI (G) e BHI/xilitol 1% (X) avaliadas nas coletas (A), (B) e (C) e seus respectivos valores para os controles negativo (UA 159) e controle positivo (TW 17)

Amostra	BHI	0h	2h	4h	8h	12h	16h
UA159	G	0,077	0,199	0,621	0,852	0,824	0,813
	X	0,063	0,174	0,405	0,622	0,604	0,577
TW17	G	0,069	0,167	0,540	0,862	0,851	0,840
	X	0,063	0,172	0,536	0,785	0,776	0,774
T11A57	G	0,043	0,088	0,226	0,721	0,701	0,685
	X	0,035	0,075	0,207	0,528	0,530	0,519
T11A15	G	0,040	0,085	0,198	0,717	0,696	0,682
	X	0,037	0,073	0,212	0,534	0,549	0,539
T11A61	G	0,038	0,070	0,179	0,628	0,641	0,630
	X	0,039	0,066	0,214	0,497	0,486	0,487
T11B25	G	0,053	0,109	0,357	0,864	0,859	0,842
	X	0,045	0,094	0,304	0,497	0,497	0,482
T11B45	G	0,044	0,095	0,333	0,804	0,786	0,787
	X	0,044	0,094	0,315	0,492	0,559	0,532
T11B49	G	0,042	0,090	0,338	0,809	0,776	0,763
	X	0,036	0,077	0,287	0,507	0,516	0,484
T11C5	G	0,046	0,091	0,335	0,773	0,736	0,725
	X	0,043	0,078	0,284	0,453	0,565	0,547
T11C17	G	0,043	0,097	0,398	0,807	0,803	0,788
	X	0,038	0,079	0,287	0,447	0,511	0,486
T11C64	G	0,043	0,078	0,330	0,789	0,759	0,731
	X	0,041	0,079	0,387	0,450	0,550	0,518

Tabela 5.14 - Valores médios de Abs_{450 nm} obtidos a partir da leitura de densidade óptica das culturas das amostras de *S.mutans*, estudadas com relação à tolerância ao xilitol, para o voluntário T12, incubadas por 16 horas, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, em meios BHI (G) e BHI/xilitol 1% (X) avaliadas nas coletas (A), (B) e (C) e seus respectivos valores para os controles negativo (UA 159) e controle positivo (TW 17)

Amostra	BHI	0h	2h	4h	8h	12h	16h
UA159	G	0,061	0,143	0,586	0,887	0,885	0,870
	X	0,045	0,116	0,383	0,579	0,603	0,582
TW17	G	0,051	0,120	0,513	0,853	0,837	0,818
	X	0,035	0,118	0,502	0,776	0,773	0,716
T12A17	G	0,038	0,094	0,310	0,711	0,714	0,722
	X	0,043	0,086	0,262	0,463	0,466	0,454
T12A41	G	0,049	0,115	0,386	0,727	0,729	0,749
	X	0,430	0,099	0,312	0,517	0,510	0,497
T12A64	G	0,038	0,086	0,293	0,720	0,729	0,729
	X	0,034	0,075	0,243	0,444	0,450	0,441
T12B15	G	0,039	0,079	0,264	0,688	0,690	0,705
	X	0,045	0,084	0,245	0,455	0,463	0,446
T12B19	G	0,033	0,061	0,190	0,575	0,608	0,625
	X	0,033	0,060	0,165	0,360	0,392	0,375
T12B13	G	0,032	0,051	0,155	0,543	0,560	0,534
	X	0,028	0,042	0,166	0,314	0,365	0,356
T12C18	G	0,023	0,032	0,133	0,516	0,540	0,511
	X	0,025	0,030	0,112	0,303	0,341	0,314
T12C35	G	0,033	0,072	0,296	0,707	0,698	0,664
	X	0,032	0,060	0,227	0,435	0,461	0,445
T12C1	G	0,037	0,066	0,271	0,709	0,717	0,651
	X	0,036	0,067	0,240	0,456	0,473	0,432

6 DISCUSSÃO

A capacidade de aderir às superfícies do esmalte dental, produzir ácidos, sintetizar polissacarídeos extracelulares e intracelulares, são considerados importantes fatores de virulência de *Streptococcus mutans* (MAO; ROSEN, 1980; HOUTE, 1994; TRAHAN, 1995; MOBLEY, 2003). A sacarose não é somente rapidamente fermentada a produtos finais ácidos, como também é o único açúcar componente da dieta que pode ser transformado em polissacarídeo extracelular, sendo, por conseqüência, considerado o mais cariogênico de todos os açúcares da dieta humana (TRAHAN, 1995; ALALUUSUA et al., 1996; MOBLEY, 2003). Poliálcoois, como manitol e sorbitol (com 6 carbonos), são fermentados muito lentamente por *S. mutans*, na presença de baixos níveis de glicose ou na ausência desta, mas são considerados menos cariogênicos (EDWARDSSON; BIRKHED; MEJÀRE, 1977; BIRKHED et al., 1979; TRAHAN, 1995; LINGSTRÖM et al., 1997; MÄKINEN et al., 2001; MOBLEY, 2003).

Os açúcares e álcoois-açúcares são transportados através da membrana citoplasmática e fosforilados por um complexo de enzimas específicas induzidas do sistema fosfotransferase (sistema-PTS). Essencialmente o carboidrato exógeno é captado por este sistema de transporte e fosforilado, através de uma seqüência em cascata de transferências de grupamentos fosfatos, até formar um composto intermediário da via glicolítica, o fosfoenolpiruvato (PEP). Este por sua vez, é degradado até o final da cadeia metabólica, gerando moléculas de ATP e

ácido láctico (TRAHAN et al., 1981; TRAHAN; MOUTON, 1987; TRAHAN, 1995; KAKUTA et al., 2003). Este mecanismo de transporte é constitutivo da célula (TRAHAN et al., 1981), desempenhando papel importante em muitas funções reguladoras, como o aprisionamento de catabólitos, transporte induzido e regulação de atividades enzimáticas, como a transcrição gênica. O catabolismo de carboidratos, dependendo de condições do ambiente, pode ser homofermentativo, levando essencialmente à produção de ácido láctico ou heterofermentativo, resultando além de ácidos, pequenas quantidades de lactato, acetato, etanol, e outros (TRAHAN, 1995). Nenhum outro estreptococo oral, além de *S.mutans*, combinatantos mecanismos eficazes para metabolizar glicose, frutose e sacarose com a capacidade de fermentar manitol e sorbitol. Estas características conferem capacidade à espécie para sobreviver e competir com outros microorganismos que ocupam os mesmos nichos (TRAHAN; MOUTON, 1987).

O xilitol, no entanto, é inútil como recurso de energia para os estreptococos orais, embora seja transportado para dentro da célula bacteriana via sistema frutose-PTS (GAUTHIER; VANDEBONCOEUR; MAYRAND, 1984; TRAHAN; MOUTON, 1987; TRAHAN; BOURGEAU; BRETON, 1996; SATO; YAMAMOTO; KIZAKI, 2000; TAPIAINEN et al., 2001). O xilitol-5-fosfato intracelular não pode ser processado, sendo tóxico para a célula bacteriana (TRAHAN; MOUTON, 1987; ROGERS et al., 1991; TAPIAINEN et al., 2001; ASSEV; STIG; SCHEIE, 2002; MAGUIRE; RUGG-GUNN, 2003; KAKUTA et al., 2003), de forma que a prevenção da captura do xilitol pode representar vantagem competitiva para a espécie em ambientes contendo este poliálcool.

Com a não conversão do xilitol em energia e o gasto extra de ATP da célula bacteriana para transportá-lo para fora, vai ocorrendo o processo de depleção da energia celular e desgaste da célula. Esta entrada e saída do xilitol, com gasto energético, é denominada 'Ciclo Fútil' e, em última instância, responsável pelo não crescimento e morte celular (TRAHAN; NÉRON; BAREIL, 1991; ROGERS et al., 1991; TRAHAN, 1995; MAGUIRE; RUGG-GUNN, 2003; KAKUTA et al., 2003).

A inibição do crescimento de SM é um dos possíveis mecanismos de ação do xilitol, responsável em grande parte, por sua atividade preventiva (KNUTILLA; MÄKINEN, 1975; MÄKINEN et al., 2001; ASSEV; STIG; SCHEIE, 2002). Esta ação do xilitol tem sido demonstrada *in vivo*, em vários trabalhos que relatam a redução do nível de SM salivar e/ou no biofilme dental (GEHRING et al., 1976; ISOKANGAS et al., 1991; SVANBERG; BIRKHED, 1991; WENNERHOLM et al., 1994; MÄKINEN et al., 1996; LINGSTRÖM et al., 1997; SIMONS et al., 1997; SÖDERLING et al., 1997; HILDEBRANDT; SPARKS, 2000; MÄKINEN et al., 2001).

Uma vez que altos níveis salivares de SM estão diretamente relacionados com risco para ocorrência da doença cárie, favorecendo o desenvolvimento de lesões (ALALUUSUA; MYLLÄENIEMI; KALLIO, 1989; ALALUUSUA et al., 1996; BOWDEN, 1997), o fato do uso do xilitol provocar a redução dos níveis de SM na saliva ou biofilme poderia induzir ao menor risco de desenvolvimento de lesões de cáries (GEHRING et al., 1976; BECKERS, 1988; ISOKANGAS et al., 1991; BIRKHED, 1994; MÄKINEN et al., 1996; ISOKANGAS et al., 2000). Ainda, utilizado em balas, gomas de mascar e/ou dentifrícios, o xilitol induz o aumento do fluxo e da capacidade do tampão salivar (GEHRING et al., 1976; BIRKHED et al., 1979; TANZER, 1995; WENNERHOLM et al., 1994; LINGSTRÖM et al., 1997; MOBLEY,

2003), podendo atuar como agente facilitador da remineralização de lesões já existentes (TANZER, 1995; SINTES et al. 2002; MAGUIRE; RUGG-GUNN, 2003).

Além disso, vários trabalhos relatam que, esta diminuição dos níveis salivares de SM em mães e gestantes, poderia retardar ou postergar a infecção de crianças por este microrganismo, prevenindo a transmissão vertical (BERKOWITZ; TURNER; GREEN, 1980; DAVEY; ROGERS, 1984; ZICKERT; EMILSON; KRASSE, 1992; LI; CAUFIELD, 1995; SÖDERLING et al., 2000; ISOKANGAS et al., 2000; SÖDERLING et al., 2001; THORILD; LINDAU-JONSON; TWETMAN, 2002).

Os resultados apresentados nas tabelas 5.1 e 5.2 são concordantes com os experimentos de Gehring et al. (1976), Isokangas et al. (1991), Svanberg e Birkhed (1991), Wennerholm et al. (1994), Mäkinen et al. (1996), Lingström et al. (1997), Simons et al. (1997), Söderling et al. (1997), Hildebrandt e Sparks (2000), Mäkinen et al. (2001), uma vez que 11 entre 12 voluntários, após 30 dias de utilização regular das gomas de mascar, 5 vezes ao dia, contendo xilitol, mesmo em baixa concentração (15%), apresentaram grande redução dos níveis salivares de SM. Embora alguns autores utilizem maiores concentrações de xilitol, especialmente em pastilhas e gomas de mascar, a eficiência de doses menores ou em baixa concentração, como a utilizada neste estudo, é de interesse. Isto permite a fabricação de produtos comerciais a custos mais baixos, tornando-os mais acessíveis a populações economicamente menos privilegiadas, uma vez que este substituto do açúcar é produto de custo elevado. Discordando com os resultados apresentados neste estudo, estão os trabalhos de Twetman e Petersson (1995), que não obtiveram redução de SM, utilizando dentifrícios com 9,7% de xilitol e os de Roberts et al. (2002), que não obtiveram redução nos níveis salivares de SM, utilizando o xilitol diretamente na dieta consumida, como substituto alternativo à

sacarose. O contato direto do xilitol com as superfícies dentais, como o que ocorre com a utilização de pastilhas, balas e gomas de mascar, parece ser fundamental para que efeitos benéficos sejam obtidos, uma vez que maiores concentrações de xilitol entram em contato com o biofilme, enquanto pequenas quantidades são ingeridas, tornando estes veículos preferenciais quando comparados aos bochechos ou diretamente no preparo da dieta (BIRKHED et al., 1979; TANZER, 1995; LYNCH; MILGROM, 2003).

No entanto, o efeito na redução de SM apresentado neste estudo, não se mostrou duradouro (Tabela 5.2), contrariando os relatos de Trahan et al. (1992), Hildebrandt e Sparks (2000), Söderling et al. (2000), Söderling et al. (2001). Estes últimos autores sugeriram que este efeito poderia prolongar-se por extensos períodos, de até 4 anos. Vale ressaltar que Söderling et al. (1991), relataram que os efeitos na redução dos níveis salivares de SM encontrados também não foram duradouros, em concordância com os resultados aqui apresentados. Embora os níveis salivares de SM continuassem menores do que os valores iniciais, trinta dias após a interrupção do uso da goma de mascar, para 7 entre 10 indivíduos que participaram da 3ª coleta, não houve diferença estatística entre estes valores e os níveis determinados no início do estudo. Além disso, os níveis salivares de SM de 2 entre estes 10 indivíduos, retornaram aos valores iniciais e um voluntário apresentou valor mais elevado do que o inicial (Tabela 5.1). Estes dados sugerem que o efeito do xilitol sobre os níveis de SM pode não ser homogêneo entre os indivíduos, sugerindo a necessidade de monitoramento microbiológico para determinar sua efetividade. As comparações entre os resultados aqui apresentados com os de outros estudos são prejudicadas devido às diferenças existentes nas concentrações de xilitol utilizadas nas gomas de mascar ou pastilhas, que diferem muito entre os

trabalhos, sendo encontradas concentrações variando de zero até 100% (WENNERHOLM et al., 1996; SIMONS et al., 1997; BIRKHED, 1979; SÖDERLING et al., 2000 e 2001; MÄKINEN et al., 1996). Embora Wennerholm et al. (1996), não tenham comparado, em seus relatos, os valores obtidos pelo grupo que usou goma de mascar sem xilitol com os do grupo que utilizou goma contendo 17,5% de xilitol, os valores comparativos entre as concentrações de 17,5% e 70%, e entre 17,5% e 35% apresentaram diferença estatisticamente significativa. A frequência de utilização também tem sido variada, sendo que há trabalhos que preconizam o consumo 2, 3 ou 5 vezes ao dia. Quanto ao período de utilização, alguns trabalhos relatam anos de consumo e outros, semanas (GEHRING et al., 1976; BIRKHED et al., 1979; TRAHAN et al., 1992; MÄKINEN et al., 1996; SÖDERLING et al., 1997; SÖDERLING et al., 2000; SIMONS et al., 1997; MÄKINEN et al., 2001; ROBERTS et al., 2002). Como o efeito parece estar ligado à dose, consumos mais intensos e freqüentes apresentam resultados mais satisfatórios. A pouca duração do efeito sobre a redução dos níveis salivares de SM obtida no presente estudo, pode ser explicada pela pequena concentração de xilitol contida no produto e/ou pelo curto período de consumo. Possivelmente concentrações maiores de xilitol ou períodos de administração mais prolongados poderiam alterar a duração do efeito, já que este é dose-dependente.

As críticas que surgem à utilização intensiva são fundamentadas no esforço mastigatório imposto à articulação temporomandibular e na possibilidade da dose exagerada causar um efeito colateral, conhecido como diarreia osmótica. Neste experimento, alguns voluntários relataram cansaço muscular e dor leve na ATM pelo estresse mastigatório, mas não houve queixa de desconforto estomacal, como os relatados por Mäkinen et al. (2001), ou intestinal, como a diarreia osmótica. Isto já

era esperado, uma vez que, neste experimento, a dose de xilitol consumida pelos voluntários foi de 1 grama por dia (1g/dia), sendo que a dose necessária para provocar diarreia osmótica deve ser maior que 25g/dia (BIJELLA; ZANELA, 1994; MOBLEY 2003; MAGUIRE; RUGG-GUNN, 2003). O cansaço muscular, provocado pelo uso de gomas de mascar, pode ser contornado pela utilização de balas e pastilhas como veículos para o consumo do xilitol.

Este efeito na redução de SM não deve ser somente atribuído ao efeito bioquímico do xilitol sobre a bactéria, uma vez que o estímulo produzido pelo ato da mastigação e salivação poderia também diminuir os níveis salivares de SM pelo aumento do fluxo salivar ou, ao menos, interferir no processo de desenvolvimento de cárie dentária (ISOKANGAS et al., 1991; WENNERHOLM et al., 1994; MACHIULSKIENE; NYVAD; BAELUM, 2001; SINTES et al., 2002). Porém, este efeito bioquímico é fato que não pode ser ignorado ou negligenciado, pois se tal efeito não existisse, trabalhos relatando o uso de gomas com outros substitutos do açúcar ou gomas placebo, deveriam apresentar resultados semelhantes, o que não ocorre comumente, como mostram os relatos de Wennerholm et al. (1994), Mäkinen et al. (1996), Söderling et al. (1997), Hildebrandt e Sparks (2000), Mäkinen et al. (2001). Estes autores mostram que o xilitol apresenta comportamento superior aos outros grupos estudados, com diferença estatística. Este fato justifica a não utilização de grupo controle consumindo gomas placebo neste estudo, uma vez que os próprios valores iniciais foram utilizados como controle para o mesmo indivíduo. Outros trabalhos também compararam o efeito do xilitol na inibição do crescimento e metabolismo bacteriano em relação a outros adoçantes, sendo os efeitos do xilitol invariavelmente superiores aos outros agentes estudados (EDWARDSSON; BIRKHED; MEJÀRE, 1977; BIRKHED et al., 1979; LINGSTRÖM, 1997; MÄKKINEN

et al., 2001; MOBLEY, 2003). Tal efeito inibitório também pode ser verificado nos resultados dos testes de tolerância *in vitro* realizados neste trabalho, discutidos mais adiante.

Todos os pacientes receberam a mesma orientação de uso do xilitol, mas foram observadas diferenças individuais no efeito sobre os níveis salivares de *S.mutans*. Estas diferenças podem ser atribuídas a diversas variáveis, entre elas a colaboração com o programa, embora outros fatores também possam interferir na atividade antimicrobiana de um agente.

As células de SM presentes na saliva são reflexo do número de sítios dentais colonizados pela bactéria (TOGELIUS et al, 1984). *In vivo*, as células bacterianas de *S.mutans* estão na forma de biofilme e como demonstra Kinniment et al. (1996), estas são mais resistentes a agentes antimicrobianos que células planctônicas. Outros fatores como idade dos biofilmes e substrato sob o qual são formados, exercem influência na capacidade antimicrobiana de agentes (DENG; BUJIS; TEN CATE, 2004). Com a maturação do biofilme, este se torna mais impermeável à entrada de carboidratos e a atividade metabólica dos microrganismos, localizados na porção mais interna dos biofilmes, é menor (DENG; BUJIS; TEN CATE, 2004). Além disso, células de *S.mutans* que crescem sob diferentes condições de pH, apresentam diferenças nos perfis de proteínas e, possivelmente, apresentam diferenças na suscetibilidade a antimicrobianos (DENG; BUJIS; TEN CATE, 2004; SVENTSÄTER; SJÖGREEN; HAMILTON, 2000). Em estudo da viabilidade celular em biofilmes através de microscopia confocal, Zaura-Arite, Van Melle e Ten Cate (2001), demonstraram que a aplicação de clorexedina é eficaz em biofilme de 6 hs, mas só era capaz de matar células bacterianas nas porções mais externas de biofilmes, formado por, no mínimo, 48 horas.

Para que a atividade inibitória do xilitol seja efetiva, as células bacterianas devem estar em processo de multiplicação, ou seja, metabolicamente ativas. Nos biofilmes, muitas células apresentam baixa atividade metabólica, especialmente nos biofilmes mais maduros, principalmente na intimidade destes, em células que estão em contato com o esmalte dental. Embora fatores como a ausência de remoção de biofilme dental pelo paciente não tenha efeito nos níveis salivares de SM (TOGELIUS et al., 1984), fatores, como a idade do biofilme dental, além de outros, poderiam explicar diferenças individuais com relação à efetividade de inibição de *S. mutans* pelo xilitol e outros agentes químicos e merecem maiores estudos, visando aumentar a sua efetividade.

Foi observado que em culturas repetidas de células bacterianas *in vitro*, em meio de cultura contendo xilitol, ocorre a emergência de uma população naturalmente xilitol-tolerante (KNUUTTILA; MÄKINEN, 1975; GEHRING et al., 1976; GAUTHIER; VANDEBONCOEUR; MAYRAND, 1984; BECKERS, 1988; TRAHAN; BOURGEOU; BRETON, 1996). Diferente das amostras selvagens, denominadas xilito-sensíveis (X^S), as cepas resistentes ou tolerantes (X^R) são consideradas aquelas cuja curva de crescimento em meio de cultura, na presença de 1% de glicose, é semelhante à curva de crescimento no mesmo meio, acrescido de xilitol, na concentração final de 0,5 a 2% (TRAHAN; MOUTON, 1987). Embora a concentração ideal não possua valor definido entre os autores, a maioria dos trabalhos sugere que a concentração final de xilitol no meio deve ser entre 0,5 a 2% (KNUUTTILA; MÄKINEN, 1975; EDWARDSSON; BIRKHED; MEJÀRE, 1977; GAUTHIER; VANDEBONCOEUR; MAYRAND, 1984; TRAHAN; MOUTON, 1987; TRAHAN; NÉRON; BAREIL, 1991; SÖDERLING et al., 1998; HRIMECH et al., 2000; TAPIAINEN et al., 2001; ROBERTS et al., 2002).

Embora ainda exista controvérsia na literatura, há relatos sugerindo haver menor eficiência nas propriedades patogênicas de amostras de *S.mutans* xilitol-tolerantes, como diminuição do mecanismo de adesão e produção de ácidos (KNUUTTILA; MÄKINEN, 1975; BECKERS, 1988; ISOKANGAS et al., 1991; BURNE et al., 1996; LINDSTRÖM et al., 1997; SÖDERLING et al., 1998, MAGUIRE; RUGG-GUNN, 1996), enquanto outros autores não encontraram as mesmas evidências (ASSEV; STIG; SCHEIE, 2002). Existem relatos que *S.mutans* X^R poderiam ser selecionados *in vivo* através do consumo freqüente, regular e prolongado do xilitol pelos indivíduos (TRAHAN; MOUTON, 1987; TRAHAN et al., 1992; SÖDERLING et al., 2000; SATO; YAMAMOTO; KIZAKI, 2000; ROBERTS et al., 2002), enquanto outros autores, como Gehring et al. (1976), após 2 anos de consumo regular, não detectaram amostras X^R, concordando com os relatos de Rogers et al. (1991).

Tem sido postulado que a resistência ao xilitol seria devido à falta de uma enzima específica no sistema-PTS, responsável pelo transporte da frutose (enzima II-frutose). Autores sugerem que as cepas resistentes tenham falha, falta ou atividade extremamente reduzida do mecanismo constitutivo da frutose-PTS (TRAHAN et al., 1981; TRAHAN; MOUTON, 1987; TRAHAN; NÉRON; BAREIL, 1991; TRAHAN, 1995; TRAHAN; BOURGEOU; BRETON, 1996; TAPIAINEN et al., 2001; BENCHABANE et al., 2002; KAKUTA et al., 2003). A hipótese de que tolerância do xilitol pelo *S.mutans* seria considerada adaptação metabólica (KNUUTTILA; MÄKINEN, 1976; GEHRING et al., 1976; BIRKHED, 1979) ou evento mutacional (GEHRING et al., 1976; GAUTHIER; VANDEBONCOEUR; MAYRAND, 1984), foram abandonadas com os relatos de Trahan et al. (1981), confirmada por Sato, Yamamoto e Kizaki (2000). A hipótese mais aceita para explicar o mecanismo de tolerância ao xilitol por *S.mutans* tem sido a proposta por Trahan e Mouton

(1987), onde os autores sugerem que, o tipo fenotípico frutose-PTS negativo (X^R), possa estar relacionado com a existência de formas alternativas (alelos) do mesmo gene. Desta forma, dois genótipos de *S.mutans* poderiam coexistir na cavidade bucal do homem moderno. Esta hipótese de haver genótipos diferentes para explicar os comportamentos de cepas X^R e X^S também é admitida por outros autores (SATO; YAMAMOTO; KIZAKI, 2000; ROBERTS et al., 2002, BENCHABANE et al., 2002; TANZER et al., 2005). Benchabane et al. (2002), obtiveram amostra mutante, com resistência ao efeito do xilitol, através da inativação do gene *fxpC*, confirmando a sugestão da falta do mecanismo constitutivo frutose-PTS. A sensibilidade ao xilitol por outras espécies bacterianas também pode ser atribuída ao sistema frutose-PTS. O gene *fxpC* pode ser detectado no genoma de outros estreptococos, incluindo *S. pneumoniae*, que é sensível ao xilitol. Esta espécie tem sido considerada como sendo único agente etiológico da otite aguda em crianças, onde a utilização de gomas de mascar contendo xilitol tem efeito protetor também com relação a esta patologia (UHARI et al., 1996; TAPIAINEN et al., 2001).

Os resultados apresentados na tabela 5.3, figuras 5.8 e 5.9, mostram a distribuição dos genótipos encontrados na saliva dos voluntários antes do experimento, após 30 dias do consumo regular de gomas de mascar, contendo 15% de xilitol, 5 vezes ao dia e 30 dias após a interrupção deste consumo. Os dados mostram que o número mínimo de genótipos identificados pela técnica utilizada (método RAPD-PCR) foi 1 e máximo 3, por voluntário.

A análise genotípica dos clones em 3 momentos distintos (Figuras 5.8 e 5.9), neste experimento, não permite afirmar que a administração do xilitol levou à identificação de genótipos diferentes dentro do mesmo indivíduo. Embora tenha sido

verificada a presença de 1 genótipo diferente na segunda coleta em 3 dos 10 voluntários, sua permanência na 3ª coleta não foi identificada em 2 dos 3 voluntários. Somente em 1 indivíduo o genótipo distinto que foi detectado na coleta (B) foi também detectado na coleta (C). Assim sendo, estes dados mostram que, a frequência na emergência de genótipos diferentes, no período do estudo, foi muito baixa. Este fato provavelmente não está relacionado com a utilização do poliálcool. Pelo contrário, tais genótipos poderiam estar presentes da mesma forma nos outros períodos, mas não foram coletados possivelmente pela proporção que os mesmos apresentavam dentro do biofilme no momento da coleta. Os dados sugerem que o consumo de xilitol não determina a emergência de um genótipo específico. Os mesmos resultados foram obtidos com o uso de clorexedina, sendo que após o uso deste antisséptico, a recolonização ocorre com os mesmos genótipos existentes previamente ao seu uso (GRÖNROOS et al., 1995). Entretanto, o benefício na redução dos níveis salivares de SM, obtido com o uso do xilitol, é considerado mais efetivo do que com a utilização da clorexedina (SÖDERLING et al., 2000; SÖDERLING et al., 2001).

Para determinação da tolerância ao xilitol, foram realizados experimentos *in vitro* com amostras obtidas *in vivo* representantes dos diferentes genótipos encontrados nas etapas experimentais (A), (B) e (C). Foram consideradas tolerantes ao poliálcool as amostras cujas diferenças de valores médios de absorvância, em meio de cultura base e acrescido de 1% de xilitol, a partir de 4 até 16 horas de incubação, não foram superiores a uma casa decimal ($=0,1$). Este valor foi aleatoriamente determinado através da comparação entre as médias apresentadas pela cepa padrão xilitol tolerante utilizada como controle positivo (TW17).

O teste de tolerância *in vitro* foi realizado com o meio de cultura BHI, que possui pequena quantidade de glicose em sua composição e comparado com o crescimento no mesmo meio, com concentração final 1% de xilitol, de acordo com o preconizado pelos autores (KNUUTTILA; MÄKINEN, 1975; EDWARDSSON; BIRKHED; MEJÀRE, 1977; GAUTHIER; VANDEBONCOEUR; MAYRAND, 1984; TRAHAN; MOUTON, 1987; TRAHAN; NÉRON; BAREIL, 1991; SÖDERLING et al., 1998; HRIMECH et al., 2000; TAPIAINEN et al., 2001; ROBERTS et al., 2002).

Com relação ao teste de tolerância *in vitro* ao xilitol, foi observado que, das 124 cepas avaliadas, representativas dos 17 genótipos encontrados, apenas 12 apresentaram crescimento semelhante em meio com e sem a adição de xilitol (TRAHAN; MOUTON, 1987; TRAHAN et al., 1992; SÖDERLING et al., 2000; SATO; YAMAMOTO; KIZAKI, 2000; ROBERTS et al., 2002). Embora nenhuma delas tenha apresentado crescimento coincidente ao controle positivo (TW17), com deficiência do gene *frul* (TANZER et al., 2005), estas amostras foram consideradas X^R. É interessante notar que as amostras T5A2, T5A16, T5A47 e T5A61 foram as que apresentaram curvas de crescimento muito semelhantes à definição proposta por Trahan e Mouton (1987) e Roberts et al. (2002). Segundo estes autores, amostra tolerante é aquela que possui curvas de crescimento iguais em meio de cultura base ou acrescido de xilitol, na concentração de 0,5 a 2%. Observando os valores obtidos para os momentos de leitura das absorbâncias, apresentados na tabela 5.4, pode-se perceber que, os valores em ambos os meios de cultura, para as amostras anteriormente citadas, foram muito semelhantes, sugerindo a obtenção de curvas de crescimento praticamente idênticas. No entanto, as amostras T2B31, T3A21, T3B1,

T9B36, T10B1, T10C37, T10C49, T19C52, também foram consideradas tolerantes. Apesar do padrão gráfico das curvas de crescimento destas amostras, em ambos os meios, não ter sido absolutamente coincidente como nas amostras anteriormente citadas, o padrão de crescimento apresentado por elas teve comportamento bastante semelhante ao apresentado pela amostra utilizada como controle positivo.

As 12 amostras xilitol-tolerantes obtidas foram isoladas de 5 indivíduos sendo que 2 voluntários apresentaram essas amostras na coleta (A), anterior ao consumo de xilitol. O fato de 5 entre 12 amostras X^R , representativas de 2 entre 10 indivíduos (20%), terem sido identificadas na coleta (A), concorda com os relatos de Trahan e Mouton (1987), que encontraram amostras *S.mutans* X^R em 10% de indivíduos não consumidores habituais de xilitol e com relatos de Trahan et al. (1992), que detectaram amostras X^R em 35% de indivíduos não consumidores habituais deste adoçante. Porém, em um destes 2 voluntários, essa amostra X^R não foi detectada nas demais coletas, fato que não está claramente elucidado. Uma das hipóteses para explicar tal ocorrência é que a redução dos níveis salivares poderia ter reduzido a prevalência deste tipo fenotípico na saliva, uma vez que, genotipicamente, o clone detectado neste voluntário, nas 3 coletas, foi o mesmo (c1). Esta redução do nível salivar de SM pode ter, na seleção aleatória dos isolados, minimizado a chance de captura desta amostra X^R nas coletas (B) e (C). Os demais voluntários não apresentaram amostras X^R no exame inicial.

Foram identificadas amostras X^R em 4 voluntários na coleta (B), porém apenas em um deles amostras X^R foram novamente identificadas na coleta (C).

Para o indivíduo T9, na coleta (B), foi detectada uma amostra X^R , representante do genótipo g2. Este genótipo não havia sido detectado na

coleta (A). No entanto, após o uso da goma de mascar, este genótipo foi detectado nas coletas (B) e (C), porém em menor prevalência do que o genótipo *g1*, como mostra a tabela 5.3. Contudo, embora na coleta (C), o genótipo *g2* tenha continuado a ser detectado, não foram selecionadas cepas X^R em nenhum dos 2 genótipos apresentados por este indivíduo (*g1* e *g2*), nesta 3^a.coleta.

No indivíduo T10, haviam sido identificados 2 genótipos na coleta (A), *h1* e *h2*. Após o uso do xilitol, 3 genótipos distintos puderam ser detectados (*h1*, *h2* e *h3*). Porém, a amostra X^R detectada na coleta (B) foi correspondente ao genótipo *h3*, detectado somente nesta coleta. Este foi o único indivíduo cuja detecção de cepas X^R continuou ocorrendo na coleta (C). No entanto, as amostras X^R identificadas na coleta (C) foram classificadas como pertencendo ao genótipo *h1*. O genótipo *h3*, detectado na coleta (B), assim como o genótipo *h2*, que esteve presente nas coletas (A) e (B) não foram identificados na coleta (C) para este voluntário.

Estes resultados reforçam o fato de que o uso do xilitol não foi determinante na emergência de genótipos distintos.

Para os outros 5 voluntários todas as amostras estudadas, representantes das 3 etapas experimentais, foram consideradas X^S .

O fato de não ocorrer detecção da diferença genotípica entre os fenótipos X^R e X^S , em amostras de *S.mutans*, neste experimento, pode ser explicado por alguns fatores. A técnica do RAPD-PCR é considerada reprodutível e com bom poder discriminatório (SÄARELLA et al., 1996; LI; CAUFIELD, 1998; GÖONROOS, ALALUUSUA, 2000; LONGO; MATTOS-GRANER; MAYER, 2003 e LEMBO, 2005).

O iniciador OPA-2, utilizado para a reação de genotipagem para esta técnica, é considerado por Li e Caufield (2001), de maior poder discriminatório do que outros iniciadores, como OPA-1, OPA-3 e OPA-4, gerando maior número de amplicons, confirmado por Longo, Mattos-Graner e Mayer (2003) e Lembo (2005). No entanto, a técnica de RAPD-PCR baseia-se na amplificação de fragmentos do gene. Utilizando iniciadores randômicos, curtos, e baixa temperatura de anelamento, os fragmentos gerados entre si são comparados. Assim, variações alélicas em determinado gene, dentro de uma população, não seriam necessariamente diferenciadas por esta técnica. Talvez o uso de outra técnica como PFGE (MINEYAMA; YOSHINO; FUKUSHIMA, 2004), pudesse apresentar outros resultados, mas que também não ocorreu nos relatos de Roberts et al. (2002).

Possivelmente a diferença genética entre os fenótipos X^R e X^S é originada pela variação alélica em genes associados ao transporte de frutose. Isto pode ser resultado de pequenas alterações na seqüência do gene como troca de aminoácidos, deleção ou inserção de bases nitrogenadas, levando, durante o processo de tradução, a alterações protéicas importantes, que podem explicar falhas no metabolismo (como no transporte da frutose e do xilitol) ou modular a expressão de outros genes no mesmo organismo.

Apesar do baixo número de amostras avaliadas por indivíduo, com relação à tolerância ao xilitol, esta análise trouxe importantes resultados. A observação de que existem células de *S. mutans* xilitol tolerantes e sensíveis de mesmo genótipo em um indivíduo, sugere que não ocorra, necessariamente, aquisição de novos genótipos X^R com o uso de xilitol; mas que variantes alélicas já existentes do mesmo genótipo, coexistem na cavidade bucal, inclusive sem o uso regular de xilitol. A observação de que 4 entre 10 pacientes apresentaram amostras X^R na coleta (B), sugere que, com

o uso regular do poliálcool, algumas destas variantes podem ser favorecidas, mas que, com a interrupção do seu uso, estas variantes alélicas perderiam a sua vantagem competitiva com as demais.

Os dados aqui apresentados sugerem que coexistem populações xilitol resistentes e sensíveis do mesmo genótipo na cavidade bucal de indivíduos e que as variantes X^R poderiam ter vantagem ecológica quando do uso regular do xilitol.

Assim, estudos são necessários para conhecimento dos determinantes genéticos e fisiológicos que levam ao aparecimento de amostras X^R *in vivo*, e do potencial cariogênico das variantes alélicas xilitol-tolerantes.

7 CONCLUSÃO

Com base nas condições experimentais empregadas no presente estudo podemos concluir que:

1. A utilização de goma de mascar contendo baixa concentração de xilitol (15%) induziu a redução dos níveis salivares de SM, porém este efeito não foi observado 30 dias após a interrupção do uso da goma.

2. Não foi detectada diferença significativa no número de genótipos de *S.mutans* na saliva de indivíduos antes, imediatamente após o uso e 30 dias após a interrupção do uso de goma de mascar contendo xilitol.

3. Apesar de ter ocorrido detecção de amostras *S.mutans* xilitol-tolerantes na saliva de 4 em 10 indivíduos imediatamente após o uso de goma de mascar contendo xilitol, as diferenças na frequência de amostras X^R , entre as etapas do estudo, não puderam ser claramente atribuídas ao uso do xilitol.

Estes dados sugerem que a redução de SM na saliva, observada após o uso de xilitol, nas condições empregadas, não foi capaz de selecionar apenas amostras xilitol-tolerantes.

REFERÊNCIAS¹

Alaluusua S, Mättö J, Grönroos L, Innilä S, Torkko H, Asikainen S et al. Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. *Archs Oral Biol* 1996;41(8):167-73.

Alam S, Brailsford SR, Willey RA, Beighton D. PCR-based methods for genotyping viridans group streptococcus. *J Clin Microbiol* 1999;37(9):2772-6.

Alaluusua S, Mylläeniemi S, Kallio M. Streptococcus mutans infection level and caries in a group of 5-year-old children. *Caries Res* 1989;23(3):190-4.

Assev S, Stig A, Scheie A. Cariogenic traits in xylitol-resistant and xylitol-sensitive mutans streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17(2):95-9.

Beckers HJA. Influence of xylitol on growth, establishment, and cariogenicity of *Streptococcus mutans* in dental plaque of rats. *Caries Res* 1988;22(3):167-73.

Benchabane H, Lortie LA, Buckley ND, Trahan L, Frenette M. Inactivation of the *Streptococcus mutans* *fxpC* Gene Confers Resistance to Xilitol, a Caries-preventive Natural Carbohydrate Sweetener. *J Dent Res* 2002;81(6):380-6.

Berkowitz RJ, Jones P. Mouth-to-mouth transmission of the bacterium *Streptococcus mutans* between mother and child. *Archs Oral Biol* 1985;30(4):377-9.

Berkowitz RJ, Jordan HV. Similarity of bacteriocins of *Streptococcus mutans* from mother and infant. *Archs Oral Biol* 1975;20(11):725-30.

Berkowitz RJ, Turner J, Green P. Primary oral infection of infants with *Streptococcus mutans*. *Archs Oral Biol* 1980;25(4):221-4.

Bijella MFTB, Zanela NLM. Substitutos da sacarose disponíveis no mercado. *CECADE News* 1994;2(3):23-9.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Birkhed D. Cariologic aspects of xylitol and its use in chewing gum: A review. *Acta Odontol Scand* 1994;52(2):116-27.

Birkhed D, Edwardsson S, Ahldén ML, Frostell G. Effects of 3 months frequent consumption of hydrogenated starch hydrolysate (Lycasin®), maltitol, sorbitol and xylitol on human dental plaque. *Acta Odontol Scand* 1979;37(2):103-15.

Bowden GH. Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? *Community Dent Oral Epidemiol* 1997;25(1):76-81.

Burne RA, Chen YYM, Wexler DL, Kuramitsu H, Bowen WH. Cariogenicity of *Streptococcus mutans* strains with Defects in Frutan metabolism Assessed in a Program-fed Specific-pathogen-free Rat Model. *J Dent Res* 1996;75(8):1572-7.

Caufield PW. Dental caries – a transmissible and infectious disease revisited: a position paper. *Ped Dent* 1997;19(8):491-8.

Clarke JK. On the bacterial factor in the etiology of dental caries. *Br J Exper Path* 1924;5:141-7.

Davey AL, Rogers AH. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. *Archs Oral Biol* 1984;29(6):453-60.

Deng DM, Bujis MJ, Ten Cate JM. The effects of substratum on the pH response of *Streptococcus mutans* biofilm and on the susceptibility to 0.2% chlorhexidine. *Eur J Oral Sci* 2004;111(1):42-7.

Edwardsson S; Birkhed D, Mejåre B. Acid production from Lycasin®, maltitol, sorbitol and xylitol by oral streptococci and lactobacilli. *Acta Odontol Scand* 1977;35:257-63.

Gauthier L, Vandeboncoeur C, Mayrand D. Loss of sensitivity to xylitol by *Streptococcus mutans* LG-1. *Caries Res* 1984;18(4):289-95.

Gehring F, Mäkinen KK, Larmas M, Scheinen A. Turku Studies X Occurrence of polysaccharide-forming streptococci and ability of the mixed plaque microbiota to ferment various carbohydrates. *Acta Odontol Scand* 1976;36(6):329-43.

Gibbons RJ, Berman KS, Knoettner P, Kapismalis B: Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule-forming streptococci of human origin. *Arc Oral Biol* 1966; 11: 549-60.

Gold OG, Jordan HV, Houte JV. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Archs Oral Biol* 1973;18(11):1357-64.

Grönroos L, Alaluusua S. Site-specific oral colonization of Mutans Streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. *Caries Res* 2000;34(6):474-80.

Gronroos L, Matto J, Saarela M, Luoma AR, Luoma H, Jousimies-Somer H et al. Chlorhexidine susceptibilities of mutans streptococcal serotypes and ribotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(4):894-8.

Hajishengallis G, Michalek SM. Current status of a mucosal vaccine against dental caries. *Oral Microbiol Immunol* 1999;14(1):1-20.

Hildebrandt GH, Sparks BS. Maintaining mutans streptococci suppression with xylitol chewing gum. *J Am Dent Assoc* 2000;131(7):909-16.

Hillman JD. Genetically modified *Streptococcus mutans* for the prevention of dental caries. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002; 82(1-4): 361-6.

Hoshino T, Kawagushi M, Shimizu N, Hoshino N, Ooshima T, Fujiwara T. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. *Diag Microbiol Infect Dis* 2004; 48(3):195-9.

Houte JV. Role of Micro-organisms in Caries Etiology. *J Dent Res* 1994;73(3):672-81.

Hrimech M, Mayrand D, Grenier D, Trahan L. Xylitol disturbs protein synthesis, including the expression of HSP-70 e HSP-60, in *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15(4):249-57.

Isokangas P, Soderling E, Pienihäkkinen K, Alanen P. Occurrence of dental decay in children after maternal consumption of xylitol chewing gum, a follow-up from 0 to 5 years of age. *J Dent Res* 2000; 79(11):1885-9.

Isokangas P, Tenovuo J, Söderling E, Männistö H, Mäkinen KK. Dental caries and Mutans Streptococci in the Proximal Areas of Molars Affected by the Habitual Use of Xylitol Chewing Gum. *Caries Res* 1991;25(6):444-8.

Kakuta H, Iwami Y, Mayanagi H, Takahashi N. Xilitol inhibition of acid production and growth of Mutans Streptococci in the presence of various dietary sugars under strictly anaerobic conditions. *Caries Res* 2003;37(6):404-9.

Kinniment SL, Wimpenny JW, Adams D, Marsh PD. The effect of chlorhexidine on defined, mixed culture oral biofilms grown in a novel model system. *J Appl Bacteriol* 1996;81:120-5.

Knuutila MLE, Mäkinen KK. Effect of xylitol on the growth and metabolism of *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 1975;9(2):177-89.

Köhler B, Andréen I, Jonsson B. The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at 4 year of age. *Oral Microbiol Immunol* 1988;3(1):14-7.

Köhler B, Bratthall D. Practical Method to facilitate Estimation of *Streptococcus mutans* Levels in Saliva. *J Clin Microbiol* 1979;9(5):584-8.

Krasse B. Human streptococci and experimental caries in hamsters. *Arch Oral Biol*, 1966;11:429-36.

Lembo FL. Análise genotípica e fenotípica de isolados de *Streptococcus mutans* provenientes de diferentes nichos da cavidade bucal de crianças livres de cárie e cárie ativas [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

Li Y, Caufield PW. The fidelity of initial acquisition of Mutans Streptococci by infants from their mothers. *J Dent Res* 1995;74(2):681-5.

Li Y, Caufield PW. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for genotypic identification of mutans streptococci from humans. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13(1):17-22.

Li Y, Caufield PW, Redmo-Emanuelsson I, Thornqvist E. Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16:16-23.

Lingström P, Lundgren F, Birkhed D, Takazoe I, Frostell G. Effects of frequent mouthrinses with palatinose and xylitol on dental plaque. *Eur J Oral Sci* 1997;105(2):162-9.

Loesche, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*, 1986; 50(4):353-80.

Longo PL, Mattos-Graner RO, Mayer MPA. Determination of mutacin activity and detection of *mutA* genes in *Streptococcus mutans* genotypes from caries-free and caries-active children. *Oral Microbiol Immunol* 2003;8:144-149.

Lynch H, Milgrom P. Xylitol and dental caries: An overview for Clinicians. *J Calif Dent Assoc* 2003;31(3):205-9.

Machiulskiene V, Nyvad B, Baelum V. Caries preventive effect of sugar substituted chewing-gum. *Community Dent Oral Epidemiol* 2001;29:278-88.

Maguire A, Rugg-Gunn AJ. Xylitol and caries prevention – is it a magic bullet? *Br Dent J* 2003;194(8):429-36.

Mäkinen KK, Chen CY, Mäkinen PL, Bennett CA, Isokangas PJ, Pape Jr HR. Properties of hole saliva and dental plaque in relation to 40-month consumption of chewing gums containing xylitol, sorbitol or sucrose. *Caries Res* 1996;30(3):180-8.

Mäkinen KK, Isotupa KP, Kivilompolo T, Mäkinen PL, Toivanen J, Söderling E. Comparison of Erythritol and Xylitol Saliva Stimulants in the Control of Dental Plaque and Mutans Streptococci. *Caries Res* 2001;5:129-35.

Mao MWH, Rosen S. Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 1980;50(10):1620-6.

Mineyama R, Yoshino S, Fukushima K. Genotypic analysis of strains of mutans streptococci by pulsed-field gel electrophoresis. *Microbiol Res* 2004;159(3):181-6.

Mobley CC. Nutrition and Dental Caries. *Dent Clin N Am* 2003;47(2):319-36.

Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushyama M, Koga T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15(4):258-62.

Redmo-Emanuelsson I, Li Y, Bratthall D. Genotyping shows different strains of mutans streptococci between father and child and within parental pairs in Swedish families. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13(5):271-7.

Roberts MC, Riedy CA, Coldwell SE, Nagahama S, Judge K, Lam M et al. How xylitol containing products affect cariogenic bacteria. *J Am Dent Assoc* 2002;133(4):435-41.

Rogers AH, Pilowisky KA, Zilm PS, Gully NJ. Effects of pulsing with xylitol on mixed continuous cultures of oral streptococci. *Aust Dent J* 1991;36(3):231-5.

Saarela M, Hannula J, Mättö J, Asikainen S, Alaluusua S. Typing of mutans streptococci by arbitrary primed polymerase chain reaction. *Arch Oral Biol* 1996;41(8-9):821-6.

Sato Y, Yamamoto Y, Kizaki H. Xylitol-induced elevated expression of the *gbpC* gene in a population of *Streptococcus mutans* cells. *Eur J Oral Sci* 2000;108(6):538-45.

Simons D, Kidd EAM, Beighton D, Jones B. The effect of chlorhexidine/xylitol chewing gum on cariogenic salivary microflora: a clinical trial in elderly patients. *Caries Res* 1997;31(2):91-6.

Sintes JL, Boneta AE, Stewart B, Volpe AR, Lovett J. Anticaries efficacy of a sodium monofluorophosphate dentifrice containing xylitol in a dicalcium phosphate dihydrate base. A 30 month caries clinical study in Costa Rica. *Am J Dent* 2002;15(4):215-9.

Söderling E, Isokangas P, Pienihakkinen K, Tenovuo J. Influence of maternal xylitol consumption on acquisition of Mutans Streptococci by infants. *J Dent Res* 2000;70(3):882-7.

Söderling E, Isokangas P, Pienihakkinen K, Tenovuo J. Influence of maternal xylitol consumption on mother-child transmission of Mutans Streptococci: 6-Year follow-up. *Caries Res* 2001;35(3):173-7.

Söderling E, Isokangas P, Tenovuo J, Mustakallio S, Mäkinen KK. Long term consumption and Mutans Streptococci in plaque and saliva. *Caries Res* 1991;25(2):153-7.

Söderling E, Trahan L, Lenander-Lumikari M. Growth of xylitol-resistant strains versus xylitol-sensitive *Streptococcus mutans* strains in saliva. *Acta Odontol Scand* 1998;56(2):111-21.

Söderling E, Trahan L, Tammiala-Salonen T, Häkkinen L.; Effects of xylitol, xylitol-sorbitol and placebo chewing gums on the plaque of habitual xylitol consumers. *Eur J Oral Sci* 1997;105(2):170-7.

Svanberg M, Birkhed D. Effect of dentifrices containing either xylitol and glycerol or sorbitol on Mutans Streptococci in saliva. *Caries Res* 1991;25(6):449-53.

Svensäter G, Sjögreen B, Hamilton IR. Multiple stress responses in *Streptococcus mutans* and the induction of general and stress-specific proteins. *Microbiology* 2000; 146:107–17.

Tanzer JM. Xilitol chewing gum and dental caries. *Int Dent J* 1995; 45(spec):65-76.

Tanzer JM, Thompson AS, Wen ZT, Burne R. So called xilitol resistance is associated with partial loss of cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Caries Res*, 2005;39(4):308.

Togelius J, Kristofersson K, Anderson H, Bratthall D. *Streptococcus mutans* in saliva: intraindividual variations and relation to the number of colonized sites. *Acta Odontol Scand* 1984;42(3):157-163.

Tapiainen T, Kontiokari T, Sammalkivi L, Ikaheimo I, Koskela M, Uhari M. Effect of xylitol on growth of *Streptococcus pneumoniae* in the presence of fructose and sorbitol. *Antimicrobiol Agent Chemotherapy* 2001;45(1):166-9.

Thorild I, Lindau-Jonson B, Twetman S. Prevalence of salivary *Streptococcus mutans* in mothers and their preschool children. *Int J Ped Dent* 2002;12(1):2-7.

Trahan L. Xylitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque – its clinical significance. *Int Dent* 1995;45(supl I):77-92.

Trahan L, Bareil M, Gauthier RL, Vandeboncoeur C. Transport and phosphorylation of a xylitol by a fructose phosphotransferase system in *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 1981;19(6):53-63.

Trahan L, Bourgeau G, Breton R. Emergence of Multiple Xylitol-resistant (Fructose-PTS) Mutans from Human Isolates of Mutans Streptococci during growth on dietary sugars in the presence of xylitol. *J Dent Res* 1996;75(11):1892-900.

Trahan L, Mouton C. Selection for *Streptococcus mutans* with an Altered Xylitol Transport Capacity in Chronic Xylitol Consumers. *J Dent Res* 1987;66(5):982-8.

Trahan L, Néron S, Bareil M. Intracellular xylitol-phosphate hydrolysis and efflux of xylitol in *Streptococcus sobrinus*. *Oral Microbiol Immunol* 1991;6(1):41-50.

Trahan L, Söderling E, Dréan MF, Chevrier MC, Isokangas P. Effect of consumption on the plaque-saliva distribution of Mutans Streptococci and the occurrence and Long-term survival of Xylitol-resistant strains. *J Dent Res* 1992;71(11):1785-91.

Twetman S, Petersson LG. Influence of xylitol in dentifrice on salivary microflora of preschool children at caries risk. *Swed Dent J* 1995;19(3):103-8.

Uhari M, Kontiokari T, Koskela M, Niemela M. Xylitol chewing gum in prevention of acute otitis media: double blind randomised trial. *BMJ*. 1996;313(7066):1180-4.

Wennerholm K, Arends J, Birkhed D, Ruben J, Emilson CG, Dijkman AG. Effect of xylitol and sorbitol in chewing-gums on Mutans Streptococci, plaque pH and mineral loss of enamel. *Caries Res* 1994;29(1):54-61.

Wunder D, Bowen WH. Action of agents on glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* in solution and adsorbed to experimental pellicle. *Archs Oral Biol* 1999;44(3):203-14.

Zaura-Arite E, van Merle J, Ten Cate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 2001;80 (5):1436-40.

Zickert I, Emilson CG, Krasse B. Effect of caries preventive measures in children highly infected with bacterium *Streptococcus mutans*. *Archs Oral Biol* 1982;27(10):861-8.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa

Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo



PARECER nº 19/03
Protocolo 212/02

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "*Prevalência e estrutura clonal de cepas de Streptococcus mutans xilitol-resistentes isoladas em indivíduos mutansmilionários*" de responsabilidade da Pesquisadora **Claudia Perez Trindade**, sob orientação da Professora Doutora **Márcia A. P. Mayer**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios referentes ao andamento da pesquisa em 14 de agosto de 2003 e em 14 de fevereiro de 2004. Ao término da pesquisa, cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEP.

São Paulo, 14 de fevereiro de 2003.


Profª Drª **Rosa Helena Miranda Grande**
Coordenadora da CEP-FOUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

NOME DO PACIENTE: _____
SEXO: _____ **DATA DE NASCIMENTO:** __/__/____
DOCUMENTO DE IDENTIFICAÇÃO: _____
ENDEREÇO: _____
BAIRRO: _____ **CIDADE:** _____
CEP: _____ **TELEFONE** _____

1- DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

Título do protocolo de pesquisa: Prevalência e Estrutura clonal de cepas de *Streptococcus mutans* xilitol-resistentes e xilitol-sensíveis isoladas em indivíduos com altos níveis salivares de SM

ORIENTADOR: Profa. Dra. Márcia Alves Pinto Mayer

Telefone: 3091-7348 (FOUSP)

Co-Orientador: Profa. Dra. Célia Regina Martins Delgado Rodrigues

Telefone: 3091-7835 (FOUSP)

Pesquisadora: Dra. Cláudia Perez Trindade

Telefone: 3091-7814 (FOUSP) ou 11-9949-2345 e 3785-2945

Rua Bento de Barros, 213, bl.3, apto 72 – Jd. Amaralina (SP) CEP:05570-200

2- EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO RESPONSÁVEL LEGAL SOBRE A PESQUISA

Este trabalho tem por objetivo verificar a presença de uma bactéria (o *Streptococcus mutans* xilitol-resistente) na cavidade oral de indivíduos que não utilizam normalmente o xilitol (um tipo de adoçante) como substituto do açúcar na sua alimentação.

Está mostrado em um grande número de trabalhos científicos que esta bactéria provoca menos cáries e é menos agressiva aos dentes do que outros tipos, sendo até por muitos considerado não cariogênica, pois não consegue utilizar o açúcar para a produção dos ácidos que atacam os dentes e causam a cárie.

Esta pesquisa será realizada através da coleta de saliva dos voluntários. A saliva será coletada através da mastigação de um pedaço pequeno de parafina mastigável, que será mastigada pelo indivíduo como se mascasse um chiclete. A saliva formada será cuspidada num pote coletor, sem causar nenhum risco ou desconforto para o voluntário. Também realizaremos um teste para saber a quantidade da bactéria que produz cáries que este indivíduo tem na sua boca. Para isso será pedido que o mesmo chupe uma espátula tipo palito de sorvete, que será levada para cultivo no laboratório de microbiologia a fim de identificar a quantidade de bactérias que este indivíduo possui na saliva. Todo material colhido será analisado em laboratório e todos os indivíduos participantes serão convidadas a participar de um programa de prevenção e controle de risco à cáries através do uso deste adoçante, o xilitol, que é um protetor contra a cárie e atua na reposição dos minerais perdidos pelos dentes. Para isto, faremos com que estes participantes utilizem o xilitol em sua dieta por 30 dias. Será oferecido para cada um uma goma de mascar que já existe no mercado brasileiro, chamada Happydent XYLIT (da Perfetti Van Melle), contendo xilitol na sua fórmula. Este chiclete será doado aos participantes pela pesquisadora, sem custeio nenhum para os mesmos. Cada participante receberá **5 de gomas de mascar por dia**, 150 chicletes ao total, e deverá consumir 5 gomas por dia, em horários livres, **por 30 dias**, sem interromper o consumo. Cada chiclete deverá mastigado por **apenas 5 minutos, totalizando 25 minutos de mastigação não nutritiva** (sem função alimentar) **ao dia**. Após este período de 30 dias, será realizada nova coleta de placa bacteriana da boca, conforme foi realizado no início da pesquisa, e outra após mais 30 dias. Será realizada novamente a análise do tipo de bactéria que permaneceu na boca do indivíduo participante após o uso do chicletes, para ver se houve mudança no tipo de bactéria, que provoque menos doença. Todas os participantes ficarão cientes do resultado de suas avaliações microbianas se assim o desejarem .

Um desconforto que não pode deixar de ser mencionado é da colaboração dos participantes em estarem utilizando os chicletes sem interrupções por 30 dias. Também deve ser explicado aos participantes que este chiclete, especificamente utilizado neste trabalho, além de não provocar cáries, pode proteger a estrutura dental, mas não é para toda goma de mascar que isto acontece, protegendo o participante de achar que mascar chicletes é bom. Devemos salientar que os pacientes devem consultar a autora da pesquisa quanto a suspensão de sua participação no trabalho, caso a pessoa sinta desconfortos maiores, como alterações estomacais ou qualquer sensação de dor na articulação responsável pela abertura e fechamento da boca, em função do ato de mascar os chicletes.

3- ESCLARECIMENTO DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE AS GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. A pesquisadora ficará à disposição dos pais e/ou responsáveis legais para quaisquer esclarecimento de dúvidas que possam surgir durante a pesquisa ou em decorrência delas.
2. Os participantes terão sua identidade resguardada e será respeitada a privacidade dos participantes. As informações colhidas de caráter pessoal, serão mantidas sob sigilo profissional.
3. Os participantes terão a liberdade de se retirarem da pesquisa por vontade própria no momento que desejarem, sem sofrerem nenhuma penalização de qualquer natureza e especialmente tem **total liberdade de se retirarem do experimento caso sintam maiores desconfortos como alterações**

estomacais e da articulação responsável pela abertura e fechamento da boca em função da mastigação destes chicletes.

5-CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador Dra. Cláudia Perez Trindade e ter entendido o que me foi explicado, estou de acordo em participar como voluntário deste protocolo de pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

assinatura do sujeito da pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(Nome legível e carimbo)

Nome:

RG: