



CRESCIMENTO E POTENCIAL ACIDOGÊNICO DE *Streptococcus mutans* ADAPTADO À FERMENTAÇÃO DE LACTOSE

Palavras-Chave: Biofilme dental, lactose e cárie dentária.

Autores:

Olavo Henrique Hoffmann [FOP-UNICAMP]

Juliana Campos Vieira [FOP-UNICAMP]

Prof. Dr. Antônio Pedro Ricomini Filho (orientador) [FOP-UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

A lactose é um carboidrato presente no leite e derivados, sendo amplamente consumida pela população em todas as faixas etárias. Apesar de ser um carboidrato fermentado por bactérias presentes no biofilme dental, o papel cariogênico da lactose ainda não é totalmente elucidado. Esse carboidrato está presente no leite bovino e humano, em concentrações aproximadas de 4,5% e 7%, respectivamente (Woodward e Rugg-Gunn, 2019). A lactose é fonte de energia para o indivíduo, principalmente no período crucial dos primeiros anos de vida (Woodward e Rugg-Gunn, 2019). Em acréscimo, pode fornecer energia para a proliferação de microrganismos no biofilme dental, sendo fermentada por diversas bactérias, incluindo *Streptococcus mutans* (Zeng et al., 2010), microrganismo associado ao desenvolvimento de cárie dental.

Apesar de ser metabolizada pelas bactérias, a lactose é considerada um carboidrato de baixo potencial cariogênico. A lactose não é prontamente metabolizada a ácidos pelas bactérias, o que resulta em quedas de pH menos proeminentes no biofilme (Rugg-Gunn et al., 1985; Muñoz Sandoval et al., 2012; Ricomini-Filho et al., 2021). Em acréscimo, a lactose, não serve de substrato para a síntese de polissacarídeos extracelulares (PEC) (Rölla, 1989; Ricomini-Filho et al., 2021), os quais contribuem para maior cariogenicidade do biofilme dental. Para que a fermentação da lactose ocorra, existe a necessidade da expressão de genes do *operon lac*, possibilitando a síntese de um conjunto de proteínas e enzimas que possibilitam o transporte e a fermentação da lactose (Zeng et al., 2010).

Apesar da lactose apresentar um menor potencial cariogênico, alguns estudos têm apontado que o consumo frequente da lactose pode promover uma adaptação das bactérias em relação ao seu transporte e catabolismo e, conseqüentemente, maiores quedas de pH (Birkhed et al., 1993; Zeng et al., 2010). A frequente exposição à lactose poderia prover adaptação das células para fermentação mais eficiente deste carboidrato, no entanto, este processo é pouco compreendido. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento e potencial acidogênico de *Streptococcus mutans* adaptado à fermentação de lactose em meio contendo, ou não tampão fosfato.

METODOLOGIA:

Delineamento experimental

O objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento e potencial acidogênico de *Streptococcus mutans* com e sem adaptação à lactose, crescido em meio de cultura contendo, ou não, tampão fosfato. No primeiro experimento, os microrganismos não foram previamente expostos à lactose (adaptados à lactose), com isso, culturas de *S. mutans* foram reativadas, padronizadas em espectrofotômetro por meio da densidade óptica (D.O.) e expostas as seguintes condições: (I) Tampão + glicose: meio low molecular weight (LMW) com tampão e com glicose 1%; (II) Tampão + lactose: meio LMW com tampão e com lactose 1%; (III) Sem tampão + glicose: meio LMW sem tampão e com glicose 1%; (IV) Sem tampão + Lactose: meio LMW sem tampão e com lactose 1%. Após as exposições, a D.O. foi verificada como indicador de crescimento bacteriano, e o pH como indicador da acidogenicidade bacteriana, inicialmente a cada 2 h (T2 e T4), seguida pela verificação a cada 1 h (T5, T6, T7, T8, T9 e T10). No segundo experimento, os microrganismos foram previamente expostos à lactose por 7 dias, para isso, as células foram incubadas em meio LMW com ou sem tampão, contendo lactose 1% (células induzidas à adaptação) ou glicose 1% (células não adaptadas como controle) nas mesmas condições descritas anteriormente. O processo de adaptação ocorreu durante 7 dias com trocas do meio de cultura a cada 24 h de exposição. Após esse período, foi realizado a curva de crescimento bacteriano e a análise de pH do meio no mesmo período de tempo do primeiro experimento. Os dados foram analisados de maneira descritiva, sendo tabulados em planilha do Microsoft Excel e gráficos realizados no programa GraphPad Prism.

1. Avaliação do meio com e sem tampão no crescimento e metabolização da cepa de *S. mutans* sem adaptação à lactose

Cepa de *S. mutans* UA 159 foi reativada em meio ágar sangue Columbia e incubada em estufa de microaerofilia a 37°C e 10% CO₂ por 48 h. Em seguida, colônias isoladas foram crescidas em meio LMW (triptona e extrato de levedura ultrafiltrado), com ou sem tampão fosfato, contendo 1% de glicose, e incubadas na mesma condição durante o período de 16 h. As culturas foram centrifugadas e as células lavadas com solução de NaCl 0,9%, sendo então ressuspensas em meio novo LMW. As suspensões de células foram padronizadas em espectrofotômetro em densidade óptica (D.O.) de $1,0 \pm 0,5$ em comprimento de onda de 600 nm para obtenção do inóculo bacteriano. Para o preparo da cultura inicial foram acrescentados 1 parte de inóculo bacteriano e 9 partes do meio de cultura contendo lactose ou glicose, dessa maneira a concentração inicial de células em cada tudo foi próximo de 0,1 em D.O. de 600 nm. As condições avaliadas foram: (I) Tampão + glicose: meio LMW com tampão e com glicose 1%; (II) Tampão + lactose: meio LMW com tampão e com lactose 1%; (III) Sem tampão + glicose: meio LMW sem tampão e com glicose 1%; (IV) Sem tampão + Lactose: meio LMW sem tampão e com lactose 1%. Após a diluição dos inóculos, os tubos foram incubados a 37°C e 10% CO₂. Durante esse período foram analisados o crescimento bacteriano pelos valores de D.O. e a fermentação dos carboidratos pela análise de pH, sendo as análises inicialmente a cada 2 h (T2 e T4), seguida pela verificação a cada 1 h (T5, T6, T7, T8, T9 e T10).

2. Avaliação do meio com e sem tampão no crescimento e metabolização da cepa de *S. mutans* com adaptação à lactose

Ao final do primeiro experimento, o inóculo utilizado foi incubado em meio LMW fresco com ou sem tampão, contendo lactose 1% ou glicose 1% nas mesmas condições descritas anteriormente, em estufa de microaerofilia a 37°C e 10% CO₂ por 24 h. Durante 7 dias, as células bacterianas foram transferidas a cada 24 horas para novo meio LMW, com ou sem tampão, contendo lactose (células adaptadas à fermentação de lactose) ou glicose (células não adaptadas à fermentação de lactose). Após esse período de 7 dias, as culturas foram analisadas como descrito anteriormente, o crescimento bacteriano pelos valores de D.O. e a fermentação dos carboidratos pela análise de pH, sendo as análises inicialmente a cada 2 h (T2 e T4), seguida pela verificação a cada 1 h (T5, T6, T7, T8, T9 e T10).

RESULTADO E DISCUSSÃO:

As Figuras 1 e 2 mostram os valores de crescimento bacteriano (D.O. 600 nm) e de fermentação (pH) ao longo do tempo. No experimento com bactérias não adaptadas é possível observar que o crescimento bacteriano do grupo tampão + glicose apresentou maiores valores de crescimento após 4 h de experimento em relação ao grupo sem tampão + glicose (Figura 1A). A diferença entre esses grupos pode ser observada no tempo de 10 h, em que o grupo tampão + glicose foi 1,1 maior, em termos de DO, quando comparado ao grupo sem tampão + glicose. O grupo tampão + lactose acompanhou os achados em relação à glicose, pois apresentou maiores valores de crescimento após 6 h de experimento em relação ao grupo sem tampão + lactose (Figura 1A). Essa diferença foi observada no tempo de 10 h, em que o grupo tampão + lactose foi 1,3 maior, em termos de crescimento, quando comparado ao grupo sem tampão + lactose.

Os valores de pH demonstraram que houve quedas de pH mais rápidas ao longo do tempo nos grupos sem tampão (sem tampão + glicose e sem tampão+ lactose) quando comparado aos grupos com tampão (tampão + glicose e tampão + lactose), o que se justifica, pois o tampão tem como função atenuar as variações dos valores de pH do meio (Figura 1B). Além disso, pode-se observar que os grupos tampão + glicose e sem tampão + glicose apresentaram maiores valores de crescimento quando comparado aos grupos tampão + lactose e sem tampão + lactose (Figura 1B). Isso ocorre, pois, a metabolização da glicose é feita por sistemas expressos constitutivamente por *S. mutans* favorecendo a rápida metabolização da glicose, o que influencia positivamente no crescimento bacteriano, conseqüentemente, nas maiores quedas de pH. Em contrapartida, para a metabolização da lactose é necessário que haja a indução do sistema *operon lac*, limitando a velocidade da metabolização da lactose, o crescimento bacteriano, corroborando com menores quedas de pH (Zeng et al., 2010).

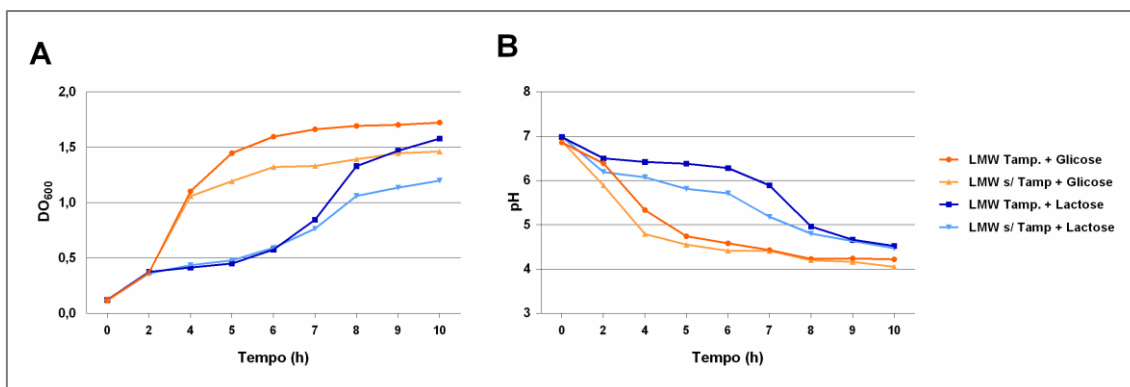


Figura 1. Crescimento bacteriano (OD₆₀₀; 1A) e produção de ácidos (pH; 1B) ao longo do tempo de culturas de *S. mutans* não adaptadas à fermentação de lactose e crescidas em meio LMW tamponado, ou não, contendo lactose ou glicose.

Como resultados obtidos foi possível observar que o meio LMW tamponado ofereceu melhor condição de crescimento para *S. mutans*. A presença de fosfato no meio contribui para o crescimento bacteriano, no entanto, houve neutralização de parte dos ácidos produzidos pelos microrganismos. Na Figura 2 é possível observar que houve a adaptação bacteriana à fermentação de lactose, tendo em vista que o padrão de fermentação foi semelhante para os microrganismos crescidos em lactose e glicose, diferentemente do observado no primeiro experimento (Figura 1).

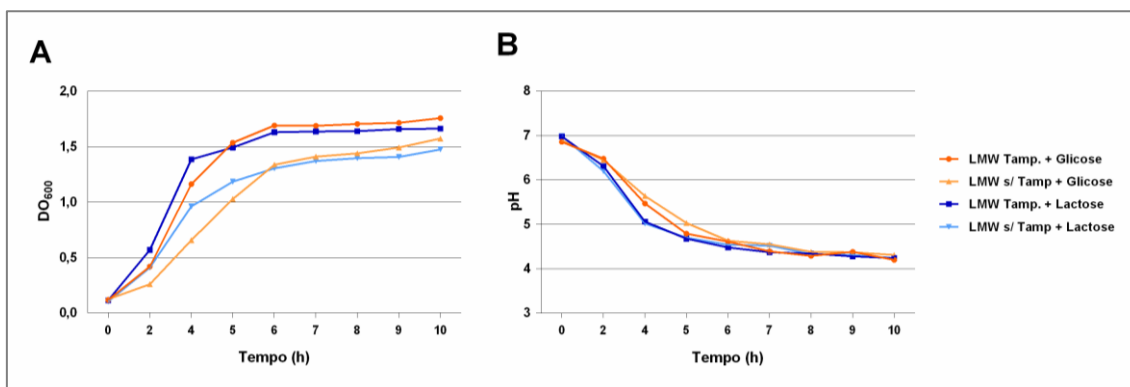


Figura 2. Crescimento bacteriano OD₆₀₀; 2A) e produção de ácidos (pH; 2B) ao longo do tempo de culturas de *S. mutans* adaptadas à fermentação de lactose e crescidas em meio LMW tamponado, ou não, contendo lactose ou glicose.

No experimento com bactérias adaptadas foi possível observar que o crescimento bacteriano do grupo tampão + glicose foi semelhante ao experimento com bactérias não adaptadas (Figura 1A), havendo maior crescimento com o meio LMW com tampão (Figura 2A). Essa superioridade do grupo tamponado foi observado também no grupo tampão + lactose. Porém, nesse experimento, o crescimento do *S. mutans* no meio com e sem tampão acrescido de lactose foi contínuo, demonstrando a adaptação da bactéria à fermentação da lactose (Figura 2A). Com isso, o microrganismo conseguiu

fermentar de maneira semelhante glicose e lactose, devido aos valores próximos de pH ao longo do tempo (Figura 2B), o que não era observado anteriormente (Figura 1B). Além disso, é importante destacar que o crescimento utilizando bactérias adaptadas do grupo tampão + lactose e sem tampão + lactose, foi 1,1 vezes maior que o grupo sem bactérias adaptadas. Isso pode ter acontecido, pois as bactérias adaptadas já induziram a ativação do sistema *operon lac*, estando metabolicamente mais ativas e conseguindo metabolizar mais rapidamente a lactose do meio.

CONCLUSÃO:

Com base nos resultados, pode-se concluir que o meio com tampão fosfato oferece melhor condição de crescimento para *Streptococcus mutans*, e que células bacterianas frequentemente expostas à lactose se adaptam à fermentação deste carboidrato, contribuindo para o crescimento bacteriano e maior potencial acidogênico.

BIBLIOGRAFIA:

BIRKHED D, IMFELD T, EDWARDSSON S. **pH changes in human dental plaque from lactose and milk before and after adaptation.** Caries Research. 1993;27(1):43–50.

MUÑOZ-SANDOVAL C, MUÑOZ-CIFUENTES MJ, GIACAMAN RA, CCAHUANA-VASQUEZ, RA, CURY JA. **Effect of bovine milk on *Streptococcus mutans* biofilm cariogenic properties and enamel and dentin demineralization.** Pediatric Dentistry. 2012;34(7):197-201.

RICOMINI FILHO AP, DE ASSIS ACM, COSTA OLIVEIRA BE, CURY JA. **Cariogenic potential of human and bovine milk on enamel demineralization.** Caries Research. 2021;55(4):260-267. doi: 10.1159/000516090.

RÖLLA G. **Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides.** Scandinavian Journal of Dental Research. 1989;97(2): 115–119.

RUGG-GUNN AJ, ROBERTS GJ, WRIGHT WG. **Effect of human milk on plaque pH in situ and enamel dissolution in vitro compared with bovine milk, lactose, and sucrose.** Caries Research. 1985;19(4):327–334.

ZENG L, DAS S, BURNE RA. **Utilization of lactose and galactose by *Streptococcus mutans*: transport, toxicity, and carbon catabolite repression.** Journal of Bacteriology. 2010;192(9):2434–2444.