

GYSELLY DE CÁSSIA BASTOS DE MATOS

**CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS RELATIVAS À DOENÇA DENTAL E
INFECÇÃO POR *Helicobacter pylori* NA CAVIDADE ORAL DE ESTUDANTES EM
BELÉM-PARÁ.**

BELEM - PA

2009

GYSELLY DE CÁSSIA BASTOS DE MATOS

**CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS RELATIVAS À DOENÇA DENTAL E
INFECÇÃO POR *Helicobacter pylori* NA CAVIDADE ORAL DE ESTUDANTES EM
BELÉM-PARÁ.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Corvelo.

BELÉM-PA

2009

GYSELLY DE CÁSSIA BASTOS DE MATOS

**CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS RELATIVAS À DOENÇA DENTAL E
INFECÇÃO POR *Helicobacter pylori* NA CAVIDADE ORAL DE ESTUDANTES EM
BELÉM-PARÁ.**

Dissertação submetida e aprovada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Patologia de Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, mediante a comissão formada pelos professores:

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Corvelo.
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Avaliadores: Profa. Dra. Ermelinda Moutinho
Instituto de Ciências da Saúde, UFPA

Profa. Dra. Ieda Guedes
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Profa. Dra. Maria da Conceição Pinheiro
Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

BELÉM-PA

2009

Dedico este trabalho ao pequenino ser que se encontra em desenvolvimento em meu ventre, a quem chamamos de Daniel, vindo em um momento de conclusão de mais uma etapa na minha vida e para mudá-la completamente.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor da minha vida, Deus, a quem eu sirvo e amo.

Aos meus pais, Rita e Ronaldo Matos, instrumentos utilizados por Deus para que eu chegasse a este mundo e que me ensinaram a ser uma pessoa digna e feliz.

Ao meu irmão preferido (e único), Gil, um grande exemplo de pessoa e a Helen Monique (apêndice do Gil) pelo imenso carinho.

Ao meu amado, Paulo Allan, com quem compartilhei os meus genes.

A minha família, em geral, pelo carinho.

A Dra. Tereza Corvelo pela orientação e pelos quatro anos e alguns meses de aprendizagem.

Ao Laboratório de Imunogenética da UFFA e a imunogalera com quem convivi desde 2005, pessoas que conheci e aprendi lições valiosas.

A todos que voluntariamente aceitaram participar desta pesquisa.

Aos AMIGOS (AS) que vibraram a cada conquista minha e principalmente durante a construção deste trabalho, Seu Lenito (Lenor Mandú); Dani Calado “Bonita de corpo”, Paula Spada “Tsunami”, Dielle Teixeira “Líder pra sempre”, Yasmin Farias “Baby lab”, Mari Mazza, Suzanne Roberta “Grávida II”, todas carinhosamente chamadas de “G ... secas” e que atendiam quando delicadamente eu dizia “Cale sua boca”.

As pessoas da “administração” do Imunogen, Délia Figueira, Charliana Aragão, Rosane Loiola e etc ...

Ao “cérebro”, Dra. Katarine Barile, por muitas e muitas coisas, com muito, muito carinho.

A UFPA, o Núcleo de Medicina Tropical e a CAPES pela oportunidade de realizar esta pós-graduação, com a qual tanto sonhei e pelo apoio financeiro.

A todo o povo da graduação, Biologia na UFPA e Medicina Veterinária na UFRA, pelos momentos de sofrimento com semestres apertados, professores e provas difíceis e pelos incontáveis momentos de alegria que vou levar na lembrança até morrer.

Aos meus animais de estimação, que em muitos momentos de “Eu não agüento mais” me trouxeram alegria abanando a cauda e dando carinho incondicionalmente.

RESUMO

A infecção pela *Helicobacter pylori* é uma das mais comuns em humanos e apesar de possuir tropismo pelo estômago, pode ser encontrada na cavidade oral, mantendo uma relação comensal com o hospedeiro, enquanto a cárie dental também é uma doença infecciosa e resulta do metabolismo da placa bacteriana. Ambas as infecções apresentam alta prevalência em países em desenvolvimento, pois estas populações estão mais expostas a fatores ambientais de risco, e normalmente são adquiridas durante a infância. A prevalência destas infecções foi investigada na cavidade oral de escolares assintomáticos para doenças gástricas, provenientes de uma população de Belém-Pa, relacionando-se a alguns parâmetros de higiene e saúde bucal, condição socioeconômica e fatores de susceptibilidade genética como os grupos sanguíneos ABO e Lewis. Foram investigados 104 indivíduos, com idade média de 17 anos. De todos os participantes foram coletadas amostras de saliva e placa dental. A saliva foi coletada para identificação do estado secretor ABO e Lewis e estimação dos parâmetros salivares, e ambas, saliva e placa dental, foram coletadas para análise molecular dos genes *16S RNAr* da *H. pylori* e *FUT2*. A *H. pylori* foi detectada em 79,8% dos escolares, com frequência de 66,35% na placa dental e 58,65% na saliva. A prevalência de cárie foi de 82,8% na população estudada. A avaliação clínica da saúde bucal mostrou que o CPO-D médio encontrado foi de 3,53. Observou-se que a experiência de cárie tende a aumentar à medida que cresce a idade e que a infecção por *H. pylori* foi maior na primeira infância. O grau de instrução e o número de visitas ao dentista mostraram diferenças significantes em relação a presença de *H. pylori*. A distribuição fenotípica dos grupos sanguíneos ABO e Lewis não mostrou diferenças significantes entre indivíduos infectados e não-infectados, que expliquem haver maior susceptibilidade genética para infecção por *H. pylori* e cárie dental. No conjunto desta análise as elevadas frequências encontradas denotam a necessidade de cuidados e tratamento das doenças dentais, como a cárie e sugere-se que a *H. pylori* na cavidade oral pode contribuir para a infecção e re-infecção do estômago após tratamento.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, cárie dental, cavidade oral, grupos sanguíneos.

ABSTRACT

The infection by *Helicobacter pylori* is one of the most common in humans and despite having tropism by stomach, can be found in the oral cavity, maintaining a commensal relationship with the host, while dental caries is also an infectious disease and results from the metabolism of the bacterial plaque. Both infections are highly prevalent in developing countries, since these populations are more exposed to environmental risk factors, and are usually acquired during childhood. The prevalence of these infections was investigated in the oral cavity of school children with no symptoms of gastric diseases, from a population of Belém-Pa, in relation to some parameters of oral hygiene and health, socioeconomic conditions and genetic susceptibility factors like the ABO and Lewis blood groups. Were investigated 104 patients, with average age of 17 years. Of all the participants were collected saliva samples and dental plaque. Saliva was collected to identify the ABO and Lewis state secretor and estimation of salivary parameters, and both, saliva and plaque samples were collected for molecular analysis of 16S rRNA genes of *H. pylori* and FUT2. *H. pylori* was detected in 79.8% of the students, with a frequency of 66.35% in dental plaque and 58.65% in saliva. The caries prevalence was 82.8% in the population studied. The clinical evaluation of oral health showed that the average CPO-D found was 3.53. It was observed that the caries experience tends to increase as in addition to age and the *H. pylori* infection was higher in early childhood. The education level and number of dentist visits showed significant differences in relation to the presence of *H. pylori*. The phenotypic distribution of ABO and Lewis blood groups did not differ significantly between infected and uninfected individuals, explaining there is greater genetic susceptibility to infection by *H. pylori* and dental caries. Throughout this analysis, the high frequencies found prove the need for care and treatment of dental diseases, such as caries and it is suggested that *H. pylori* in the oral cavity can contribute to infection and re-infection of the stomach after treatment.

Keywords: *Helicobacter pylori*, dental caries, oral cavity, blood groups.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Diagrama de co-agregação bacteriana na superfície dental.....	17
FIGURA 2 - Desenho esquemático da morfologia da <i>H. pylori</i>	23
FIGURA 3 - Fatores de virulência da <i>Helicobacter pylori</i> envolvidos na patogênese gástrica.....	25
FIGURA 4 - Ilustração do padrão de amplificação do gene 16S do RNA ribossômico da <i>H. pylori</i> em gel de agarose 1%.....	46
GRÁFICO 1 - Relação entre idade e índice de <i>S. mutans</i> e <i>Lactobacillus</i> na cavidade oral de estudantes em Belém-Pará (2008).....	49
GRÁFICO 2 - Relação entre idade em anos, cárie e <i>H. pylori</i> na cavidade oral de estudantes em Belém-Pará (2008).....	50
FIGURA 5 - Caracterização dos fenótipos de grupos sanguíneos ABO e Lewis na saliva pela Técnica Dot-ELISA em membrana de nitrocelulose.....	55
FIGURA 6 - Padrão de digestão enzimática da mutação G428A pela enzima XbaI em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio.....	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Pares de iniciadores e condições da PCR para amplificação e detecção dos polimorfismos do gene <i>Secretor (FUT2)</i>	43
TABELA 2 - Distribuição do gene <i>16S RNAr</i> da <i>H. pylori</i> em amostras de saliva e placa dental entre os estudantes examinados.....	46
TABELA 3 - Avaliação Clínica da condição de saúde bucal de estudantes em Belém-Pará (2008).....	47
TABELA - 4. Modelo de Regressão Logística para marcadores de risco para cárie na cavidade oral de estudantes em Belém-Pará (2008).....	51
TABELA 5 - Modelo de Regressão Logística para marcadores de risco para <i>H. pylori</i> na cavidade oral de estudantes em Belém-Pará (2008).....	52
TABELA 6 - Práticas de higiene oral relacionadas à experiência de cárie e presença de <i>H. pylori</i> na cavidade oral de estudantes em Belém-Pará (2008).....	53
TABELA 7 - Características sócio-econômicas relacionadas à experiência de cárie e presença de <i>H. pylori</i> na cavidade oral de estudantes em Belém-Pará (2008).....	54
TABELA 8 - Distribuição dos fenótipos salivares ABO e Lewis, estado secretor em relação à presença de cárie, de <i>S. mutans</i> e <i>H. pylori</i> na cavidade oral de estudantes em Belém-Pará (2008).....	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	ASPECTOS DA MICROBIOTA DA CAVIDADE ORAL	13
1.2	CARACTERÍSTICAS SALIVARES.....	15
1.3	PLACA DENTAL.....	17
1.4	CÁRIE DENTAL.....	18
1.5	<i>Helicobacter pylori</i> NA CAVIDADE ORAL.....	23
1.6	OS POLIMORFISMOS DE GRUPOS SANGUÍNEOS ABO E LEWIS DO HOSPEDEIRO E A INTERAÇÃO COM A MICROBIOTA ORAL.....	29
1.6.1	O estado secretor ABH na associação com a cárie dental	31
1.6.2	O sistema de grupo sanguíneo Lewis e a colonização pela <i>H. pylori</i>	32
2	OBJETIVOS	34
2.1	GERAL	34
2.2	ESPECÍFICOS	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	CASUÍSTICA.....	36

3.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	36
3.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	36
3.4	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	37
3.5	COLETA E PROCESSAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	37
3.5.1	Coleta da saliva para determinação dos antígenos de grupo sanguíneo Lewis e estado secretor ABH; para determinação da velocidade de fluxo salivar, capacidade tampão, teste microbiológico e extração de DNA.....	37
3.5.2	Coleta da placa dental.....	38
3.6	DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS LABORATORIAIS.....	38
3.6.1	Determinação da velocidade de fluxo salivar e capacidade tampão salivar.....	38
3.6.2	Teste Microbiológico.....	39
3.6.3	Dot-ELISA.....	39
3.6.4	Extração de DNA bacteriano e humano.....	40
3.6.5	Amplificação e detecção dos polimorfismos do gene <i>Secretor</i> (<i>FUT2</i>) por RFLP-PCR.....	41
3.6.6	Detecção do DNA da <i>H. pylori</i> na cavidade oral.....	44
3.7	APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS.....	44
4	RESULTADOS.....	45

4.1	DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS SANGUÍNEOS ABO e LEWIS, ESTADO SECRETOR ABH E GENOTIPAGEM DOS INDIVÍDUOS DE ACORDO COM O GENE <i>SECRETOR</i> ATRAVÉS DA PCR-RFLP.....	55
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO 1	87
	ANEXO 2	88

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS DA MICROBIOTA DA CAVIDADE ORAL

A cavidade oral é a porção inicial do trato gastrointestinal, que é de crucial importância para a saúde do organismo (LOSTER et al., 2006). É o habitat de uma microbiota anfibionte - não patogênica - diversa que inclui mais de 600 espécies de microrganismos já identificadas (PRATTEN et al., 2003; MIZOBE-ONO et al., 2006). Rautemaa et al. (2007) destacam a presença de bactérias, protozoários e micoplasmas compondo essa rica e complexa microbiota.

Pelas suas particularidades anatômicas, a cavidade oral, constitui um ambiente favorável para a colonização e proliferação de microrganismos, os quais, em condições normais, mantêm-se em equilíbrio nos diversos microambientes orais (gengiva, língua, dentes) (MEURMAN et al., 1997).

Este estado de homeostase entre os microrganismos e com o hospedeiro é prejudicado quando há alterações substanciais do ambiente, como por exemplo, alto consumo de sacarose, higiene oral deficiente, imunossupressão do indivíduo, perda da integridade da mucosa, xerostomia e proliferação descontrolada da microbiota normal e/ou oportunista (TEANPAISAN & DAHLÉN, 2006).

Segundo Rouabhia (2002) a maioria dos microrganismos existentes na boca organiza-se em comunidades sésseis chamadas biofilmes - depósitos orgânicos na superfície dos dentes - que tem sua formação intensificada em decorrência de higiene bucal inadequada (MOMOSE et al., 2003). A fisiologia e metabolismo dos biofilmes são complexos, permitindo a sobrevivência da comunidade microbiana inteira, muitas bactérias que crescem neste ambiente são resistentes à fagocitose e

à morte pelo sistema imunológico do hospedeiro, assim como ao efeito de drogas antimicrobianas (GROSSI, 2000).

A grande maioria da microbiota oral nativa é comensal, no entanto, algumas espécies têm capacidade cariogênica, como por exemplo, os *Streptococcus* do grupo *mutans* (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivaris* e *Streptococcus mutans*) e *Fusobacterium*, comumente encontradas em amostras de pus de infecções cariogênicas (RAUTEMAA et al., 2007).

Os *S. mutans* são os pioneiros na adesão à película oral, possibilitando a sucessão ecológica na placa dental, de bactérias aeróbias para micro-aerófilas, anaeróbias facultativas e finalmente anaeróbias, de acordo com a espessura da placa (ALMEIDA et al., 2002; HOSHINO et al., 2004). Também estão comumente associados a carie dental nas superfícies lisas dos dentes (ALMEIDA et al., 2002).

Os *Lactobacillus* são considerados membros residentes da microbiota oral tendo um importante papel no balanço microecológico, mas por não apresentarem capacidade de aderir às superfícies dentárias, estão mais ligados à progressão da cárie nas superfícies retentivas do dente e não ao seu início (MEURMAN & STAMATOVA, 2007).

As espécies da *Lactobacillus* mais comuns encontradas na saliva por Teanpaisan & Dahlén (2006) foram: *L. fermentatum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. acidophilus* e *L. plantarum*, três destes possuem cepas probióticas, que tem demonstrado efeitos benéficos na saúde geral, como a estabilização da flora intestinal (SIMARK-MATTSSON et al., 2007). Adicionalmente, já foi observado o efeito inibitório de *Lactobacillus* utilizados como probióticos sobre o crescimento da *Helicobacter pylori* coletada de biópsia gástrica (SGOURAS et al., 2004; LÓPEZ-BREA et al., 2008).

Outros microrganismos que fazem parte da microbiota oral são o *Actinobacillus actinomyce-temcomitans* e a *Porphyromonas gingivalis*, que freqüentemente estão associados com doença dental (SMIECH-SLOMKOWSKA & JABLONSKA-ZROBEK, 2007). A levedura mais comum encontrada na cavidade oral é a *Candida albicans* (RAUTEMAA et al., 2007).

1.2. CARACTERÍSTICAS SALIVARES

A saliva é importante para uma variedade de funções na cavidade oral, ela forma uma barreira que atua na manutenção da integridade, da hidratação e da lubrificação dos tecidos orais, além disso, é também, essencial para a alimentação (MIZOBE-ONO et al., 2006). Ela contém ainda um sistema tamponante que neutraliza a acidez formada durante o metabolismo bacteriano e mineral necessário para a remineralização do esmalte dental (ALMSTAHL & WIKSTRON, 1999).

A secreção salivar contém anticorpos, especialmente IgA, importante para o sistema de defesa das mucosas; substâncias antimicrobianas, como a lisozima, que é bactericida, e a lactoferrina, que tem um efeito bacteriostático, e fornece substrato ao metabolismo bacteriano através de mucinas e aglutininas que tem a capacidade de ligar-se às bactérias (BENNEDETO, 2002).

A quantidade de saliva produzida pelas glândulas é muito importante para a manutenção da saúde oral, sendo produzida entre cerca de 1000 a 1500 mL diariamente (KOHLENER et al., 1983). Quando a secreção salivar é baixa, podem ser esperados o aumento do número de microrganismos na saliva e da espessura da placa bacteriana devido o seu acúmulo (ALMSTAHL & WIKSTRON, 1999).

Segundo Kohler et al. (1983) o baixo fluxo salivar eleva a viscosidade da saliva, contribuindo para o aumento do acúmulo da placa e o risco de cárie e doença periodontal. O acesso a substâncias antimicrobianas também diminui quando a secreção salivar diminui isto pode ser seguido por um aumento nas espécies microbianas associadas com infecções oportunistas (ALMSTAHL & WIKSTRON, 1999).

Apesar de não ser um fator essencial à ocorrência de cárie, a saliva, desempenha um papel muito importante na patogênese da doença ao condicionar a expressão clínica das lesões através de vários mecanismos, nomeadamente, uma ação de limpeza das superfícies dentárias, a eliminação do substrato, a importante capacidade tampão e a sua ação antibacteriana (AREIAS et al., 2008).

A capacidade tampão salivar é ressaltada, pois quando o pH do fluido da placa na superfície dental atinge valores em torno de 5,7 a 5,5 (pH crítico para o esmalte) devido à liberação de ácidos orgânicos, principalmente o láctico, ocorre dissolução de cristais de hidroxiapatita, liberando íons cálcio e fosfato no fluido da placa dental - desmineralização (KOHLENER et al., 1983).

Almsthal & Wikstron (1999) demonstraram que a capacidade tampão diminui quando as taxas de secreção salivar estão baixas. A partir da ação tamponante da saliva ocorre elevação gradual do pH do fluido da placa, saturado de íons cálcio e fosfato, que em condições normais voltam a se depositar na superfície dental (KOHLENER et al., 1983).

A aglutinina é uma proteína salivar glicosilada sintetizada nas células serosas das glândulas submandibulares, sublinguais e parótidas, importante para a ligação de uma ampla variedade de microrganismos, tais como: *S. mutans*, *S. salivarius* e *S. sanguis* envolvidos na formação da placa dental (MIZOBE-ONO et al., 2006).

1.3. PLACA DENTAL

A placa é um biofilme oral formado na superfície dos dentes (Figura 1), habitada por milhões de microrganismos (JIA et al., 2009). A remoção constante das superfícies mucosas por descamação previne o acúmulo de grandes quantidades de microrganismos aderidos às mucosas, o mesmo não ocorre com os dentes, pois apresentam superfícies duras que não descamam (LANG, 1997; GROSSI, 2000).

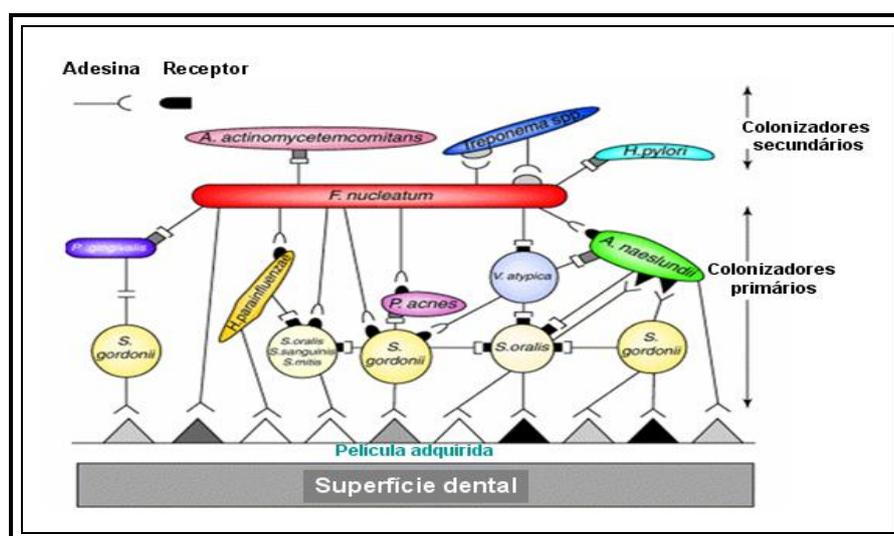


Figura 1: Diagrama de co-agregação bacteriana na superfície dental, adaptado de RICHARD et al. (2003).

O desenvolvimento do biofilme oral ocorre normalmente em duas fases distintas: 1ª) proteínas de superfície bacteriana interagem com o hospedeiro ou produtos bacterianos são adsorvidos na superfície do dente; 2ª) ocorre um acúmulo de bactérias por agregação e produção de uma matriz polissacarídica extracelular (NAPIMOGA et al., 2005).

Já a formação da placa dental segue da seguinte maneira, a colonização inicial é feita por um grupo de organismos Gram-positivos, principalmente

Streptococcus, seguida por uma sucessão de várias espécies, e culmina na chegada de bactérias anaeróbias Gram-negativas como a *Porphyromonas gingivales*, um patógeno predominante na periodontite severa em adultos (ROUABHIA, 2002).

A consequência mais significativa da formação do biofilme na estrutura dental é a contínua liberação dos componentes da superfície celular das bactérias para a cavidade oral, como toxinas e enzimas que resulta em uma resposta do tecido local, podendo levar a formação de ulcerações (GROSSI, 2000).

Devido algumas bactérias não apresentarem a capacidade de ligarem-se diretamente as superfícies dentais, estas aderem-se à película de origem salivar, uma finíssima membrana que envolve toda a superfície oral inclusive os dentes (NAPIMOGA et al., 2005). De acordo com Shivakumar et al. (2009) a película salivar é composta principalmente por glicoproteínas, dentre elas a fucose, que medeia a ligação do *S. mutans*, considerado o agente etiológico principal da cárie dental, a superfície do dente, e deste as outras espécies bacterianas (LAMONT et al., 1991; OHO et al., 1998).

1.4. CÁRIE DENTAL

Considerada uma doença infecciosa, transmissível e crônica, de caráter multifatorial, a cárie dental é caracterizada por uma desmineralização da estrutura dentária provocada por ácidos resultantes do metabolismo de microrganismos presentes na placa bacteriana (PINELLI et al., 2000; NAPIMOGA et al., 2005; MOTTA et al., 2006; SHIVAKUMAR et al., 2009). A infecção atinge os humanos principalmente no período da infância (SIMARK-MATTSSON et al., 2007).

É uma doença que tem início antes do desenvolvimento da lesão clinicamente detectável, no esmalte dentário, que é uma estrutura biológica acelular e desprovida de vasos e nervos, explicação para o fato das lesões se instalarem e desenvolverem sem despertar uma reação inflamatória (AREIAS et al., 2008).

Os diversos fatores etiológicos envolvidos na doença estão relacionados ao hospedeiro (tecidos dentários susceptíveis à dissolução ácida), ao agente (bactérias orais com potencial cariogênico) e ao ambiente (substrato adequado à satisfação das necessidades das bactérias cariogênicas), nomeadamente o consumo freqüente de hidratos de carbono refinados (AREIAS et al., 2008).

A variabilidade individual do risco de cárie está relacionada, principalmente, com a dieta consumida e com o número de organismos cariogênicos presentes na placa bacteriana e na saliva, citando-se que as principais bactérias associadas à predisposição ao risco de cárie são o *S. mutans* e os *Lactobacillus* (PINELLI et al., 2000; CORTELLI et al., 2004).

Dentre as diferentes doenças que acometem a boca, a cárie dentária é uma das mais relevantes, devido particularmente a sua alta prevalência nas diferentes populações (KAMAROSKI et al., 2005). No entanto, essa prevalência foi diminuindo em muitos países industrializados nas últimas décadas, principalmente devido à expansão de substâncias a base de flúor, entretanto, a doença ainda continua sendo o principal problema clínico e a maioria das crianças a manifesta (SIMARK-MATTSSON et al., 2007).

A exposição freqüente ao flúor associada com modificações na ingestão de carboidratos fermentáveis, maior acesso aos serviços odontológicos e ampliação da educação em saúde bucal são fatores considerados responsáveis pelo declínio na prevalência e na severidade da cárie dentária em países desenvolvidos (AREIAS et

al., 2008). Por outro lado, em países subdesenvolvidos, não tem ocorrido redução muito significativa do comprometimento da saúde dentária, uma vez que a condição sócioeconômica da população parece exercer influência direta na prevalência da doença, ressaltando a necessidade de mudanças sociais, e não apenas modificações dos hábitos individuais (CORTELLI et al., 2004).

A bactéria *S. mutans* coloniza a superfície dos dentes (SIMARK-MATTSSON et al., 2007), e está envolvida na lesão de cárie com um número de características como sua capacidade de interagir com a sucrose através de glicosiltransferases; de produzir grande quantidade de ácido (acidogenicidade) e tolerância a exposição a ambientes com pH baixo (acidúria) (BEIGHTON, 2005). Além disso, ele ainda produz uma mutacina, que pode facilitar seu estabelecimento na placa dental (BEIGHTON, 2005).

Devido sua grande habilidade adesiva e ácido-secretora, é o coco Gram-positivo mais rotineiramente isolado da placa dental, das lesões cariosas e da saliva (KAMAROSKI et al., 2005). Dados obtidos a partir de um estudo longitudinal mostraram que indivíduos com níveis elevados de *S. mutans* na saliva apresentam atividade de cárie mais acentuada do que indivíduos com baixos níveis (CORTELLI et al., 2004), a presença de 10^6 unidades formadoras de colônia por milímetro de saliva (SMIECH-SLOMKOWSKA & JABLONSKA-ZROBEK, 2007), representa o número indicativo de atividade de cárie acentuada (CORTELLI et al., 2004).

A mãe é a fonte mais importante de infecção primária de *S. mutans* e *S. sobrinus* para as crianças e a saliva é o principal veículo de transmissão (NAPIMOGA et al., 2005).

As mutacinas são proteínas antibióticas que conferem vantagem ecológica em comunidades diversas como o biofilme dental, a mutacina produzida pelo *S. mutans* pode facilitar a transmissão de mãe para filho (considerada fonte primária de

infecção) e aumenta as taxas desta espécie no biofilme dental (NAPIMOGA et al., 2005).

Uma dieta rica em sacarose também exerce papel fundamental na etiologia da cárie dentária, já que esse carboidrato é facilmente fermentado e metabolizado pelos *S. mutans*, os quais produzem ácidos e polissacarídeos extracelulares, além disso, a consistência e frequência de ingestão interferem com o poder cariogênico destes organismos (CORTELLI et al., 2004).

Os carboidratos são os alimentos com maior potencial cariogênico, pois ao entrarem em contato com a placa bacteriana causam queda do pH oral (AJDIC et al., 2002). Entre os carboidratos mais cariogênicos estão os monossacarídeos, como a frutose, a lactose, a glicose e a maltose e dissacarídeos como a sacarose (LANG, 1997). A sacarose é o açúcar mais comumente encontrado em alimentos industrializados e consumido em grandes quantidades, principalmente pelas crianças (FERNANDES et al., 1995).

O potencial cariogênico da sacarose consiste no fato do açúcar penetrar na intimidade da placa dental levando a produção de ácido quando metabolizada e serve também como substrato para enzimas, como frutossil e glicosiltransferases para formar polissacarídeo extracelular insolúvel (AJDIC et al., 2002).

Assim, a cárie dental é o resultado de uma infecção que apresenta caráter multifatorial envolvendo fatores genéticos, como susceptibilidade do hospedeiro (SIMARK-MATTSSON et al., 2007), fluxo salivar, composição da saliva, e também fatores ambientais, como a microbiota bacteriana específica, dieta alimentar, qualidade da higiene bucal e exposição ao flúor (CALFIELD & GRIFFEN; HERZBERG & KAPLAN, 2000).

Essa evidencia esclarece a complexidade do problema, quando a lesão de cárie não é tratada e resulta em um dano irreversível ou perda de elemento dentário,

com comprometimento da função mastigatória e da estética (ZERO, 1999), com o agravamento de que a prevenção, o controle e o tratamento nem sempre são garantidos de maneira eficaz pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

O indicador de saúde bucal CPO-D (número médio de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados), é um índice recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que mede e compara a experiência de cárie dental nas populações (CYPRIANO et al., 2005).

A idade de 12 anos é adotada internacionalmente como parâmetro básico para uso do indicador. Os valores do índice correspondem aos seguintes graus de severidade: muito baixo (0 a 1,1), baixo (1,2 a 2,6), moderado (2,7 a 4,4), alto (4,5 a 6,5) e muito alto (6,6 e mais) (CYPRIANO et al., 2005).

Valores elevados indicam más condições de saúde bucal da população, freqüentemente associadas a condições socioeconômicas desfavoráveis, a dificuldade de acesso aos serviços de saúde e aos hábitos deletérios, como consumo excessivo de açúcares, além de limitado acesso ao flúor.

Para o ano de 2000, a OMS havia estipulado como meta, índice CPO-D de três aos 12 anos de idade (CORTELLI et al., 2004) e aos 18 anos 85% das pessoas devem apresentar todos os dentes permanentes irrompidos presentes. As metas da saúde bucal para o ano de 2010 são de CPO-D menor que 1 aos 12 anos de idade e não haver perda dental, aos 18 anos de idade, devido à cárie ou doença periodontal.

De acordo com um levantamento realizado pelo Ministério da Saúde em várias capitais brasileiras no período de 2002/2003, o CPO-D encontrado na região Norte foi de 3,1, valor considerado moderado.

1.5. *Helicobacter pylori* NA CAVIDADE ORAL

A *Helicobacter pylori* é um patógeno de crucial importância, associada a diferentes doenças gástricas, como úlcera péptica, gastrite e linfoma de tecido linfóide associado à mucosa (MALT), e é considerada como fator de risco no desenvolvimento de câncer gástrico (LIU et al., 2008; MORALES-ESPINOSA et al., 2009). É uma bactéria Gram-negativa, de forma espiralada (Figura 2) ou cocóide e microaerófila que coloniza naturalmente a mucosa gástrica de primatas humanos e não-humanos (CAN et al., 2008).

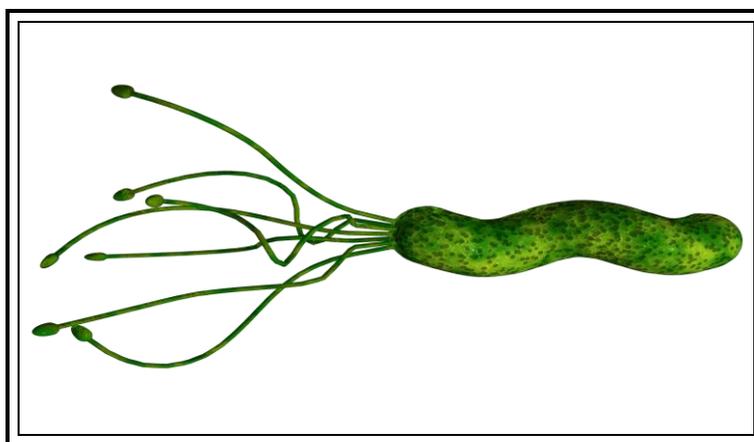


Figura 2: Desenho esquemático da morfologia da *H. pylori*.

Fonte: <http://www.hpylori.com.au>.

A sua distribuição está diretamente relacionada às condições sócio-econômicas e de saneamento das regiões (MALATY, 2007). Segundo Rossi-Aguiar et al. (2009) a soroprevalência é de 50% em países desenvolvidos. Nas populações de países em desenvolvimento é maior que 80%, sendo que a taxa de infecção é elevada em todas as faixas etárias, devido à transmissão do microrganismo ser

facilitada pelas precárias condições de higiene e aglomerados humanos (KODAIRA et al., 2002; PORTAL-CELHAY & PEREZ-PEREZ, 2006; CLINE et al., 2007).

No Brasil a soroprevalência para *H. pylori* foi estimada em 65% por Zaterca et al. (2007), esta prevalência está associada a ambientes populosos, condição de higiene precária, falta de saneamento básico e contato próximo. Em Belém, Pará, foi descrita uma prevalência de 74% em pacientes com gastrite (AGUIAR et al., 2002) e de 93% em pacientes com úlcera gástrica (MARTINS et al., 2002).

Barile et al. (2009) verificaram em seu estudo, considerando o nível sócioeconômico de uma população em Belém-Pa, que no grupo de baixo nível econômico a prevalência foi maior. Além disso, a região Norte apresenta elevada frequência de patologias gástricas, incluindo úlcera e adenocarcinoma (INCA, 2008).

A *H. pylori* apresenta características especiais que lhe permitem vencer os mecanismos de defesa do hospedeiro e causar doenças. Os diferentes determinantes patogênicos da bactéria podem ser divididos em dois grupos: fatores de virulência, que contribuem para os efeitos patogênicos; e fatores de proteção, que permitem que a bactéria colonize e permaneça no hospedeiro (CAN et al., 2008).

Diversos são os fatores de virulência (Figura 3) relacionados à patogenicidade da *H. pylori*, entre eles, o flagelo, que a bactéria utiliza para se movimentar e controlar a direção do movimento através de respostas quimiotáticas (AMIEVA & EL-OMAR, 2008). A enzima urease, que é essencial para que o ambiente ácido do estômago seja neutralizado e ocorra a colonização (KIGNEL et al., 2005; OLIVEIRA-SEVERO et al., 2006; CLINE et al., 2007).

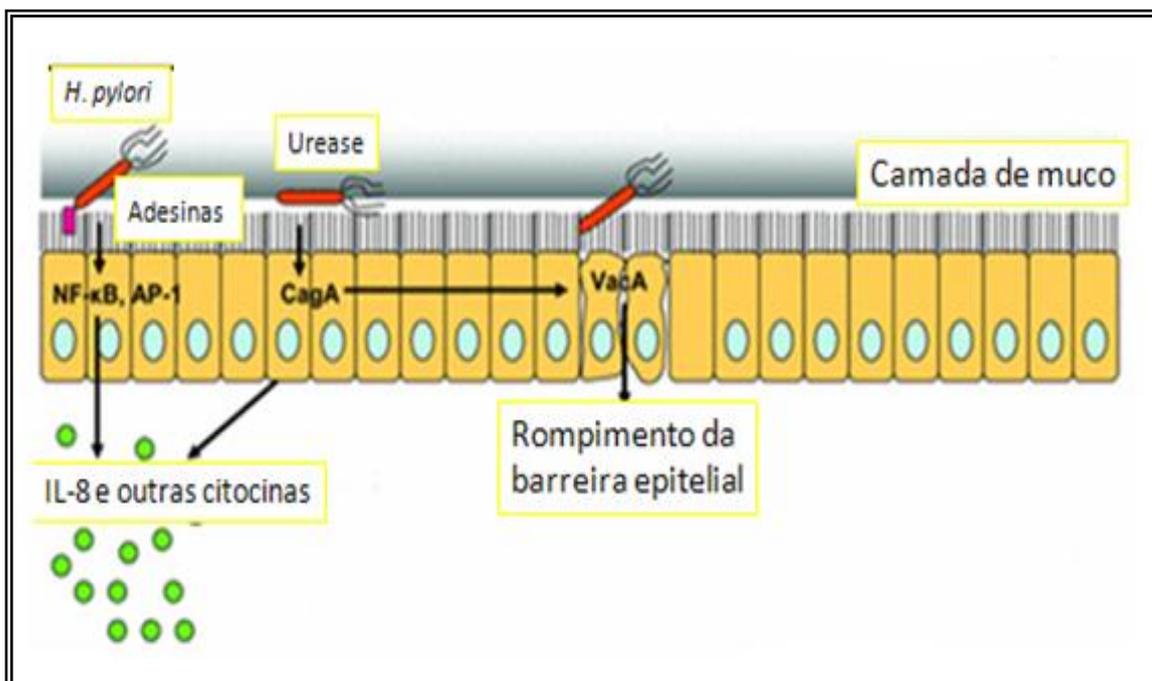


Figura 3: Fatores de virulência da *H. pylori* envolvidos na patogênese gástrica modificado de Portal-Celhay & Perez-Perez (2006).

O gene *vacA* da *H. pylori* codifica a citotoxina vacuolizante A, que induz a vacuolização celular e permite a entrada da uréia e nutrientes para a bactéria através da formação de vacúolos, induz ainda, apoptose, alteração no processo de apresentação de antígeno e inibição da ativação de células T (MOBLEY et al., 2001; CLINE et al., 2007).

Este gene está dividido em duas regiões variáveis, a região sinal “s” (alelos s1 e s2) e a região média “m” (alelos m1 e m2) (KHOELER et al., 2002). A combinação entre os alelos das regiões s e m determina a virulência das cepas. Aquelas portadoras do genótipo *vacA* s1/m1, são as mais patogênicas, pois sintetizam grandes quantidades de toxina, já as cepas s1/m2 sintetizam quantidades moderadas e as cepas s2/m2 produzem pouca ou nenhuma toxina (LADEIRA et al., 2003).

O gene *cagA*, presente na ilha de patogenicidade Cag (Cag-PAI), está associado com aumento da inflamação devido a aumentar a expressão do fator de transcrição fator nuclear κ B (NF κ B) nas células epiteliais e estimular a maior liberação de interleucina 8 (IL-8); estimula a proliferação celular (WILLHITE & BLANKE, 2004) e metaplasia da mucosa gástrica nas cepas *cagA*⁺ (SUERBAUM & JOSEPHANS, 1999; CLINE et al., 2007).

Os mecanismos de transmissão ainda não estão totalmente elucidados, a evidência universalmente aceita é que a bactéria apenas consegue alcançar o estômago através da boca, pois se trata de um microrganismo não invasivo (KODAIRA et al., 2002; UMEDA et al., 2003). A transmissão parece ocorrer de pessoa para pessoa nas formas oral-oral, gástrica-oral e fecal-oral, e a cavidade oral parece ser importante no processo de transmissão da bactéria ou na re-infecção do estômago após a terapia de erradicação (TORRES et al., 2000; YOUNG et al., 2001; KIGNEL et al., 2005; DIAS & PAUL, 2007).

A infância é o período no qual a transmissão ocorre mais freqüentemente e alguns países apresentam índice de mais de 90% de crianças infectadas com 10 anos de idade, a aquisição da infecção está relacionada à infecção na mãe, irmãos e também a um grande número de pessoas residindo num mesmo ambiente (TINDBERG et al., 2001; AMIEVA & EL-OMAR et al., 2008).

A *H. pylori* é encontrada principalmente no estômago humano, mas a utilização de técnicas moleculares tem permitido que a bactéria seja encontrada na cavidade oral e também nas fezes (YOUNG et al., 2001), além de ela ter sido cultivada de amostras de vômito (SUZUKI et al., 2007).

A primeira documentação da presença da *H. pylori* na cavidade oral ocorreu em 1989, quando a bactéria foi cultivada da placa dental de 29 pacientes com doenças gástricas associadas à bactéria (KRAJDEN et al., 1989). Mas a cultura da

bactéria oral encontrou um sucesso limitado, quando esta foi isolada da placa dental ou saliva, pois foram detectadas taxas consistentemente baixas (MAJMUDAR et al., 1990; D'ALESSANDRO & SERI, 1992). A inabilidade para cultivar a *H. pylori* oral pode ser atribuída à complexidade da microbiota oral junto com a natureza exigente da *H. pylori* que requer um ambiente microaerófilo e mais de sete dias de incubação para crescer (DOWSETT & KOLOWIK, 2003; CHATOPADHAYAY et al., 2004).

Posteriormente, a *H. pylori* foi isolada da saliva (FERGUSON et al., 1993; OSHOWO et al., 1998; SONG et al., 2000), na placa supragengival (AVCU et al., 2001), na placa subgengival (RIGGIO & LENNON, 1999; GEBARA et al., 2004), no dorso da língua (DOWSETT, 1999; OSHOWO et al., 1998) e na superfície de câncer de cavidade oral (OKUDA, 2000). Entretanto os resultados encontrados são controversos. Assim, a prevalência da *H. pylori* encontrada na cavidade oral pode variar de 0% (OLIVIER et al., 2006) a 100% (SONG et al., 2000).

O isolamento da bactéria de amostras de placa dental, vômito e saliva, indicam que a transmissão pode ser oral-oral (ATHERTON, 1997), e levanta a questão de que a boca pode abrigar este patógeno e ser a fonte para a re-infecção do estômago após tratamento, ou a boca seria apenas um reservatório transitório para a bactéria chegar até o estômago (KILMARTIN, 2002; GEBARA et al., 2004; LOSTER et al., 2006; NAMIoT et al., 2007). De forma que a sua eliminação da cavidade oral pode ser uma forma de evitar a re-colonização do estômago por este microrganismo, além de evitar a transmissão pela rota oral-oral (PARSONNET et al., 1999).

Admite-se que a *H. pylori* seja eliminada nas fezes, contaminando os alimentos e a água, que podem servir como veículos de transmissão (fecal-oral) (PARSONNEET et al., 1999; KIGNEL et al., 2005). Queralt & Araújo (2007) concluíram que a bactéria é resistente à água, mas sua presença neste meio é

acidental. A presença do DNA da *H. pylori* em amostras de água sugere o possível papel da forma cocóide na transmissão da doença, uma vez que estas formas persistem no ambiente por um longo tempo (CAN et al., 2008).

O resultado de vários estudos tem sugerido uma associação positiva entre a detecção da *H. pylori* oral e gástrica, mas os métodos utilizados falharam em demonstrar tal associação (MAPSTONE et al., 1993; OSHOWO et al., 1998; PARSONETT et al., 1999). Ferguson et al. (1993) isolaram *H. pylori* da saliva de um de nove indivíduos com *H. pylori* gástrica e encontraram a mesma cepa existente no estômago.

Chitsazi et al. (2006) analisaram a presença da *H. pylori* em placa dental associando com o diagnóstico para infecção gástrica, que mostrou não haver relação entre a presença da bactéria na placa dental e infecção no estômago e conseqüentemente não teve valor como diagnóstico de infecção gástrica. Os resultados distintos encontrados em diferentes estudos contribuem para a dúvida se a *H. pylori* constitui-se como microbiota permanente na cavidade oral ou transiente.

Okuda et al. (2000) descobriram que *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, ambas bactérias responsáveis por doença dental são capazes de aderir a *H. pylori* e que bactérias componentes do biofilme, como *S. mutans* podem produzir proteínas inibitórias tipo bactericinas, que inibem o crescimento da *H. pylori*, fato que suporta a idéia de que a *H. pylori* ocorre transientemente na cavidade oral .

Tem sido sugerido que a *H. pylori* pertence à microbiota normal da cavidade oral de humanos, mantendo-se em simbiose com o hospedeiro, mas presente em números tão pequenos que é difícil uma identificação confiável, outro fato é que a bactéria quando presente seja resultado de refluxo gástrico (KILMARTIN, 2002; LOSTER et al., 2006).

Alternativamente a fonte da *H. pylori* oral pode ser o estômago, com a bactéria atingindo a boca via vômito ou refluxo gástrico (DOWSETT & KOWOLIK, 2003). Autores afirmam que a cavidade oral não só é um reservatório potencial para a infecção do estômago, como também é um reservatório potencial para re-infecção após terapia (DOWSETT & KOWOLIK, 2003; KIGNEL et al., 2005).

1.6. OS POLIMORFISMOS DE GRUPOS SANGUINEOS ABO E LEWIS DO HOSPEDEIRO E A INTERAÇÃO COM A MICROBIOTA ORAL

Os antígenos de grupos sanguíneos ABO são moléculas expressas sobre a superfície dos eritrócitos de humanos e de alguns primatas antropóides (NOMURA et al., 1998). Estes antígenos são estruturas carboidráticas, sintetizadas por uma série de reações enzimáticas, cujo passo final em sua biossíntese é feito pelas glicosiltransferases A e B, codificadas por alelos do *locus* ABO (SAITOU & YAMAMOTO, 1997; YAMAMOTO, 2004).

O sistema sanguíneo ABO é gerado pela ação dos *loci* ABO, H/h e Se/se, produzindo diversos oligossacarídeos através de uma biossíntese complexa, que ocorre de maneira diferenciada nas hemácias e em células de outros tecidos, devido à sua natureza bioquímica e genética (MOOR-JANKOWSKI & WIENER, 1969).

Sabe-se que a síntese de estruturas H está sob o controle de pelo menos dois sistemas genéticos polimórficos *H-h* e *Se/se* sendo que os genes *Se* e *H* codificam cada, distintas fucosiltransferases que trabalham preferencialmente em diferentes cadeias precursoras, Tipo 1 e Tipo 2, respectivamente (ORIOLE et al., 1981; BETTERIDGE & WATKINS, 1986).

O gene *Secretor* é determinante para a expressão dos antígenos ABH nos fluidos corporais (SOCHA et al., 1995). Isto acontece, pelo fato dos indivíduos dos

grupos sanguíneos A, B e AB expressarem transferases que convertem a cadeia precursora H em seus determinantes A e B, já os do grupo O que não apresentam estas transferases continuam a expressar somente a estrutura básica H (O'DONELL et al., 2000).

Os antígenos do grupo sanguíneo Lewis são estruturalmente relacionados aos antígenos ABH, estes antígenos compreendem carboidratos Tipo 1 (Lewis a e b) e Tipo 2 (Lewis X e Y) e são regulados por duas fucosiltransferases produtos dos genes *FUT2* e *FUT3* (SOEJIMA et al., 2009).

O gene *FUT2* (Secretor) codifica uma alfa(1,2)fucosiltransferase que catalisa a transferência de uma fucose ao terminal galactosiltransferase da substância precursora Tipo 1 e produz o antígeno H tipo 1, por isso ele determina o estado secretor dos antígenos ABH nos fluidos corporais (DANIELS, 2002). Indivíduos que tem ao menos um alelo funcional *FUT2* são secretores e expressam antígenos ABH em sua saliva, enquanto não secretores, não expressam antígenos ABH em sua saliva e são homozigotos para alelos não funcionais *FUT2* (SOEJIMA et al., 2009).

Vários polimorfismos no *locus Se* já foram descritos, entre estes os que reduzem ou inativam a sua produção enzimática. Existem dois polimorfismos no *locus Secretor* freqüentemente descritos nas populações humanas, o G428A e o A385T (KELLY et al., 1995; KODA et al., 1996). Cerca de 20% das pessoas apresentam mutações que inativam o gene *Secretor*, estes indivíduos são denominados de não secretores, por não apresentarem as substâncias ABH e conseqüentemente ausência do antígeno Le^b nas células epiteliais e nas secreções (KODA et al., 1996).

Existem outros polimorfismos que diminuem a atividade da enzima produto do gene *FUT2* originando indivíduos secretores fracos. Neste caso supõe-se que as quantidades dos antígenos Le^a e Le^b na saliva estejam alteradas (KELLY et al.,

1995). Conseqüentemente, o risco para doenças vem sendo associado com o estado secretor, porque muitos patógenos iniciam sua colonização pela ligação não covalente aos carboidratos de grupos sanguíneos de superfície celular, a exemplo do antígeno Le^a, implicado como receptor do *S. mutans* (LIGTEMBERG et al., 2000).

O gene *FUT3* (Lewis) codifica uma alfa(1,3/1,4)fucosiltransferase que catalisa a transferência de uma fucose ao subterminal N-acetilglucosamina do precursor Tipo 1 e sintetiza o antígeno Lewis a em não-secretadores, enquanto a enzima atua no substrato Tipo 1 e produz o antígeno Lewis b nos secretadores (SOEJIMA et al., 2009).

Tem sido sugerido que os antígenos Lewis, mas especificamente o antígeno Lewis b, é um receptor de epitélio para a *H. pylori* estando implicado na infecção (SOEJIMA et al., 2009). A ligação com o epitélio é um dos fatores considerados como pré-requisito para a colonização microbiana, sendo mediada por moléculas de superfície da bactéria, as adesinas (OBERHUBER et al., 1997).

Bóren et al. (1994) mostraram que o antígeno de grupo sanguíneo Le^b medeia a ligação da *H. pylori* a mucosa gástrica humana. Adicionalmente, foi observado que pessoas com grupo sanguíneo do tipo O (ABO) tem mais receptores para a bactéria e que o tecido gástrico sem o antígeno Le^b não permite a ligação da bactéria (OBERHUBER et al., 1997).

1.6.1. O estado Secretor ABH na associação com a cárie dental

A adesão inicial de bactérias como o *S. mutans* ocorre com glicoproteínas salivares, particularmente nos epítomos de grupos sanguíneos ABO e Lewis, estes epítomos são oligossacarídeos encontrados nas células epiteliais dos tratos oral, gastrointestinal, respiratório, entre outros, e também nas secreções por eles

produzidas, os quais possuem resíduos de L-fucose que parecem atuar nesta interação (HOGG & EMBERY, 1982; LIGTENBERG et al., 1990; CIOPRAGA et al., 1995; LIGTEMBERG, 2000).

Assim, considera-se que a ligação do *S. mutans* à superfície do dente é mediada pela interação entre adesinas bacterianas e receptores produzidos pelo indivíduo e secretados na saliva (LIGTEMBERG, 2000). De forma que, os indivíduos portadores do genótipo secretor teriam uma proteção natural contra doença de cárie e os não secretores seriam geneticamente mais susceptíveis à colonização pelo *S. mutans*, constituindo-se em grupo de risco para o desenvolvimento da cárie, por apresentarem grandes quantidades do antígeno Le^a na saliva.

Um questionamento que necessita ser mais bem averiguado é a relação entre o *S. mutans* e o hospedeiro, considerando a variabilidade genética do indivíduo e deste microrganismo colonizador, que certamente elevam ou diminuem a incidência da doença na cavidade oral (LIGTEMBERG et al., 1990). Neste sentido, é de interesse averiguar se os diferentes antígenos dos referidos sistemas de grupos sanguíneos podem influenciar na prevalência da cárie dental.

1.6.2. O sistema de grupo sanguíneo Lewis e a colonização pela *H. pylori*

A *H. pylori* pode aderir firmemente às células do epitélio gástrico, ligando-se aos receptores celulares do hospedeiro através das adesinas (SUERBAUM & JOSEPHANS, 1999; MOBLEY et al., 2001; OLIVEIRA-SEVERO et al., 2006). A adesina que media esta ligação é a BabA, um fator de virulência da bactéria que é codificado pelo gene *babA2* (TORRES et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003).

A adesão da bactéria a mucosa gástrica representa o contato inicial com o hospedeiro, entre as propriedades aderentes da *H. pylori* estão incluídas a

hemaglutinação, a ligação ao epitélio e a ligação a oligossacarídeos ou proteínas da matriz extracelular (OLIVEIRA-SEVERO et al., 2006). Várias cepas de *H. pylori* podem aderir ao antígeno de grupo sanguíneo Le^b, encontrado sobre a superfície das células do epitélio gástrico e no muco gástrico (CLINE et al., 2007).

Bóren et al. (1994) demonstraram que os receptores para a bactéria no epitélio gástrico são os antígenos H e Le^b e que os fenótipos O e Le(a-b+) expressam uma grande quantidade destes antígenos fucosilados em comparação com outros grupos e esta diferença predispõe estes indivíduos a infecção pela bactéria. Esta observação pode ser reforçada ainda pelo fato de sujeitos do grupo sanguíneo O, apresentarem risco aumentado para doenças relacionadas com a *H. pylori*, tal como úlcera péptica (ROTHENBACHER et al., 2004).

Como pouco é conhecido a respeito da colonização da cavidade oral pela *H. pylori*, analisar a relação entre os fenótipos de grupos sanguíneos ABO e Lewis do hospedeiro pode ajudar a esclarecer o envolvimento destas bactérias durante a formação da placa dental. E ainda, uma questão que precisa ser avaliada é a relação entre esta colonização com os níveis de higiene e infecção por cárie nos indivíduos estudados.

Por esta razão, investigar a detecção da *H. pylori* na placa dental ou saliva pode fornecer a base para o papel da transmissão desta bactéria, que pode ser diretamente disseminada de pessoa a pessoa, constituindo-se em um fator de risco de infecção gástrica. Acredita-se que, estratégias mais efetivas para o tratamento e prevenção de doenças gástricas podem depender do perfil de colonização oral da *H. pylori*. Conseqüentemente, identificar formas de controle bacteriano na cavidade oral, que podem ajudar a prevenir a re-colonização do estômago.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Investigar as condições de saúde bucal relacionada à experiência de cárie dental e a colonização pela *H. pylori*, assim como a expressão dos antígenos de grupos sanguíneos ABO e Lewis na cavidade oral, como marcadores de susceptibilidade na interação patógeno-hospedeiro, em uma amostra de escolares infanto-juvenis de Belém do Pará.

2.2. ESPECÍFICOS

- Aferir a prevalência de experiência de cárie na amostra infanto-juvenil estudada e o risco pelos critérios de CPO-D.
- Identificar por PCR a presença de DNA da bactéria *H. pylori* na cavidade oral.
- Analisar os parâmetros relativos aos aspectos clínicos (fluxo salivar, capacidade tampão da saliva, contagem de UFC/mL referentes às bactérias *S. mutans* e *Lactobacillus* e o índice CPO-D), a higiene bucal e aspectos epidemiológicos da saúde oral e se estariam associados com proteção ou predisposição a experiência de cárie e a colonização pela *H. pylori* na cavidade oral.

- Determinar as frequências dos fenótipos salivares Lewis e o estado secretor ABH pelo método Dot-ELISA entre os indivíduos estudados.

- Identificar a presença das mutações G428A e A385T no gene *FUT-2* pela técnica de RFLP-PCR em indivíduos do fenótipo Le^a.

- Verificar associação da expressão antigênica ABH e Lewis com a presença das bactérias *H. pylori* e *S. mutans* na cavidade oral.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

No período de maio a julho de 2008 foram coletadas 104 amostras de saliva e placa dental na Escola Doutor Celso Malcher, Terra Firme (Belém-Pa), considerando a faixa etária de 05 a 20 anos de idade. Um cirurgião dentista foi responsável pela avaliação dentária dos voluntários, além da coleta das amostras de placa dental. Todas as amostras biológicas foram colhidas das após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Anexo1).

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA (Protocolo 005/2008) conforme rege a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, sobre aspectos éticos envolvendo a pesquisa com seres humanos.

3.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo indivíduos ou responsáveis que:

- Aceitaram participar do estudo mediante a assinatura do TCLE.
- Não utilizaram antibioticoterapia sistêmica há pelo menos dois meses.
- Eram assintomáticos para doenças gástricas.

3.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo indivíduos ou responsáveis que:

- Eram menores de 05 anos e maiores 20 anos de idade.

3.4. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Um questionário (Anexo 2) foi respondido por todos os participantes da pesquisa, com questões dirigidas à identificação pessoal, condições sócioeconômicas, higiênicas e sanitárias. As informações foram completadas com as avaliações odontológicas e testes laboratoriais.

3.5. COLETA E PROCESSAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO

3.5.1. Coleta da saliva para determinação dos antígenos de grupo sanguíneo Lewis e estado secretor ABH; para determinação da velocidade de fluxo salivar, capacidade tampão, teste microbiológico e extração de DNA.

Primeiramente os indivíduos receberam um frasco estéril e foi solicitada a coleta da saliva sem qualquer estímulo, para tipificação dos antígenos de grupos sanguíneos ABO e Lewis e extração de DNA. Em seguida os indivíduos foram orientados a realizar movimentos semelhantes aos movimentos da mastigação por um período de 5 minutos, depositando a saliva em um tubo estéril graduado, com capacidade para 15 ml, a fim de se avaliar o volume e a velocidade do fluxo salivar expressa em mL/minuto, para aferição da capacidade tampão e teste microbiológico com o Kit CTR-Bactéria (Ivoclar-Vivadent). O material foi conservado em ambiente refrigerado e transportado para o Laboratório de Imunogenética do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará.

3.5.2. Coleta de placa dental

A placa dental foi coletada por um odontólogo com auxílio de microescova. O material foi armazenado em microtubo estéril e congelado para posterior extração de DNA.

3.6. DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS LABORATORIAIS

3.6.1. Determinação da velocidade de fluxo e Capacidade tampão salivar

Para determinação do fluxo salivar foi considerado segundo o critério de Sreebny & Valdini (1987):

- Fluxo normal \geq a 1 mL/minuto.
- Hipossalivação \geq a 0,5 mL/minuto e \leq a 1 mL/minuto.
- Xerostomia \leq a 0,5 mL/minuto.

Para a verificação da capacidade tampão foi utilizado 1 mL de saliva estimulada. O pH inicial foi medido com uma tira de indicação de pH universal. Em seguida foi acrescentado 3 mL de solução de HCl 5mM, e agitado até a eliminação do dióxido de carbono (CO₂) que se formava. Após 5 minutos era feita nova leitura para averiguar a variação do pH. Considerou-se de acordo com Silver & Krasse (1987):

- Capacidade tampão normal: quando a saliva apresentou pH final variando entre 5,0 e 7,0.
- Capacidade tampão baixa quando o pH final foi inferior a 5,0.

3.6.2. Teste Microbiológico

Foi empregado o kit CRT-Bactéria (Ivoclar Vivadent), com os meios de cultura agar *mitis salivarius* contendo bacitracina para *S. mutans* e agar rogosa para *Lactobacillus*, comprimidos contendo mistura geradora de gás carbônico e uma escala com quatro densidades populacionais das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de *S. mutans* e *Lactobacillus*. O teste foi realizado segundo as recomendações do fabricante.

3.6.3. Dot-ELISA

A técnica Dot-ELISA, modificada por Pflug et al. (1989), foi utilizada para a detecção dos antígenos ABO e Lewis e o estado secretor ABH na saliva:

Com uma micropipeta, retirou-se 5µL de saliva diluída 1:10 em solução salina 0,9% e aplicado em membrana de nitrocelulose. Após o material ser fixado em estufa a 37°C por 45 minutos foram bloqueadas as áreas livres da membrana com tampão bloqueador (Tris-NaCl-HCl-triton 0,5%, pH 7,4 e albumina bovina 22%) por 45 minutos à temperatura ambiente e com agitação mecânica constante.

A membrana foi incubada em câmara úmida por 12 horas com anticorpos monoclonais primários (anti-Le^a 1:500; anti-Le^b 1:500; anti-A 1:100; anti-B 1:50 e anti-H 1:100) em tampão de diluição (Tris-NaCl-HCl-triton 0,5%, pH 7,4 e albumina bovina 22% e anticorpo secundário anti-IgM conjugado a fosfatase alcalina na diluição 1:1000).

A seguir, a membrana foi lavada três vezes com tampão Tris-NaCl-HCl-Triton 0,5%, pH 7,4 e duas vezes com tampão Tris-NaCl-HCl pH 7,4 durante 5 minutos cada lavagem, em agitação mecânica constante. Mergulhou-se a membrana

no tampão de revelação (25 mL de glicina/NaOH pH 10,4; 500µL de MgCl₂ 0,1M; 500µL de ZnCl₂ 0,1M e 100µL de solução substrato-50 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato/1 ml de dimetilformamida) a 37°C até a visualização de pontos azuis brilhantes no local da reação antígeno-anticorpo. Lavou-se em água corrente e secou a temperatura ambiente para realização da leitura e análise do resultado.

3.6.4. Extração de DNA bacteriano e humano

O DNA foi extraído das amostras de placa dental e de saliva utilizando-se o método do fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989):

No microtubo contendo a amostra (saliva ou placa dental) do indivíduo, foi adicionado 20µL de proteinase K e 300µL de solução de lise de leucócitos (100 mM de Tris-HCl, 20 mM de EDTA, 200 mM de NaCl, 1% de dodecil-sulfato de sódio e 0,2% de marcptoetanol).

Agitou no vortex cerca de 15 segundos e incubou em banho-maria a 58° C por 12 horas. Posteriormente, adicionou-se a cada microtubo 300µL de tampão saturado de fenol e igual quantidade de clorofórmio, agitou por 10 minutos em agitador gangorra e centrifugou por 5 minutos a 14000 rotações por minuto (RPM), retirou o sobrenadante transferindo para um tubo limpo.

Foi Adicionado 500µL de solução de clorofórmio-isopropanol (diluição 24:1), agitou por 15 minutos e centrifugou por 5 minutos a 14000 RPM, retirou o sobrenadante e transferiu para um tubo limpo. Repetiu-se este procedimento mais uma vez.

Adicionou-se 900µL de álcool isopropílico, inverteu-se o tubo lentamente até visualização da nuvem de DNA. Centrifugou por 10 minutos a 14000 RPM, lavou o tubo com 200µL de etanol a 70%, centrifugou por 1 minuto, aguardou-se evaporar

todo o etanol, adicionou 150µL de água bidestilada e autoclavada para hidratar o DNA, durante uma hora à temperatura ambiente. Após a hidratação o DNA foi congelado a – 20°C, para posterior análise.

3.6.5. Amplificação e Detecção dos polimorfismos do gene *Secretor (FUT2)* por RFLP-PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação do segmento total do gene *FUT2* (1170 pb) foi produzida a partir de DNA molde humano extraído da saliva. A PCR foi realizada utilizando os iniciadores TK1 e TK2 (Tabela 1) do seguinte modo:

Aos oligonucleotídeos (1µM de cada) foi adicionado a 1µL de DNA genômico num volume final de 50µL contendo 200 µM de cada dNTP, 10 mM Tris-Hcl (pH 8,8), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂. Foram gerados trinta ciclos usando termociclador da marca Eppendorf (94°C por 1 minuto, 65°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos). A PCR foi monitorada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com 1µL de brometo de etídio.

Uma segunda PCR foi realizada para a detecção dos pontos de mutação G428A e A385T, utilizando 1µL do produto da amplificação do *Sec2* sobre as mesmas condições já citadas, exceto a temperatura de anelamento e os iniciadores (Tabela 1).

Os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão por endonucleases específicas para detecção da presença ou ausência das mutações (Tabela 1). Para cada amostra de DNA amplificado foi utilizada aproximadamente cinco unidades da enzima diluída em tampão apropriado. O DNA amplificado e a solução enzimática

foram adicionados nas mesmas proporções em tubos de microcentrífuga e incubados a 37°C, em banho Maria, por 12 horas.

Após o período necessário para ocorrer a digestão enzimática, as amostras foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose a 3% com tampão TBE (Tris 0,09M, EDTA 0,002M e ácido bórico 0,09M) e corado com 1µL de brometo de etídio, para observação dos fragmentos esperados, de 84 pb e de 23 pb, para a mutação G428A e também dois fragmentos, um de 51 pb e um de 29 pb, para a mutação A385T.

Tabela 1. Pares de iniciadores e condições da PCR para amplificação e detecção dos polimorfismos do gene *Secretor (FUT2)*.

Iniciador	Seqüência (5'-3')	°C anelamento /tempo	°C extensão /tempo	Nº ciclos	Tamanho do fragmento (pb)	Enzima/ sítio de restrição
tk1	CTCGAATTCGGGCCTCCATCTCCCAGCTAAC	65°/2 min.	72°/1 min.	30	1170	-
tk2	CTCAAGCTTGCTTCTCATGCCCCGGGCACTC					
tk3	CGCTTCACCGGCTACCCCTGCTTCT	60°/2 min	72°/1 min.	30	107	Xbal
tk4	AACTTCTGGGCCTCCTCCCGCA					5'-T↑C T A G A-3'
tk7	AACGACTGGATGGAGGAGGAATACCGCAGC	60°/2 min	72°/30 seg.	40	80	AluI
tk8	AAGGTCCAGGAGCAGGGGTAGCCGGTGAAG					5'-A G↑C T-3'

Fonte: modificado de Kudo et al., 1996.

3.6.6. Detecção do DNA da *H. pylori* na cavidade oral

Para a detecção do DNA da *H. pylori* na placa dental e na saliva foram utilizados os pares de iniciadores 16S-R: 5'-CTCACGACACGAGCTGAC-3' e 16S-F: CTATGACGGGTATCCGGC-3', que amplificam um segmento de 780 pares de bases de uma região do gene 16S do RNA ribossômico da bactéria. Para a PCR foi utilizada uma solução contendo tampão padrão de PCR 1X [200 mM TrisCl, 500 mM KCl (pH 8.4)], 0,1 mM de cada base nitrogenada; 0,2µL de Taq Polimerase Platinum (Invitrogen); 5 pmoles de cada oligonucleotídeo; 1µL de amostra de DNA, e água estéril para um volume final de 25µL.

Os parâmetros de termociclagem foram: 3 minutos a 94°C para a desnaturação inicial, 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C para o anelamento dos iniciadores e 1 minuto a 72°C e 7 minutos a 72°C para a extensão final, por 45 ciclos em termociclador da marca Eppendorf.

3.7. APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS

A análise dos resultados foi feita através do programa de computação BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007). A significância estatística foi aceita ao nível de 95%.

4. RESULTADOS

Foram estudados 104 indivíduos, assintomáticos para doenças gástricas, selecionados aleatoriamente na Escola Estadual Doutor Celso Malcher, sendo que 62 pertenciam ao sexo feminino e 42 ao sexo masculino, com faixa etária média de 17 anos e mínima e máxima de 06 e 20 anos, respectivamente.

Os agravos avaliados foram a presença de cárie dental e da bactéria *H. pylori* na cavidade oral. Além de também terem sido analisadas as características socioeconômicas e hábitos relacionados à higiene oral, como fatores de risco para a saúde bucal, e ainda, os grupos sanguíneos ABO e Lewis como marcadores de predisposição genética do hospedeiro a estas infecções.

No exame bucal observou-se que dos 104 escolares investigados, 19,2% (20/104) estavam livres de cárie, mas a prevalência da infecção aproximou-se de 80%. A demonstração da presença do DNA da bactéria *H. pylori* foi testada em amostras de saliva e placa dental, amplificadas através da PCR com oligonucleotídeos iniciadores para o gene *16S RNAr* desta bactéria, sendo observado fragmentos de 780 pares de bases (Figura 4). O gene *16S RNAr*, espécie-específico para a *H. pylori* foi detectado em 79,8% (83/104) escolares.

Uma freqüência de detecção de *H. pylori* de 66,35% (69/104) foi descrita em amostras de placa dental comparada as amostras de saliva com positividade de 58,65% (61/104) pelo Teste de Kappa (p valor = 0,003). Deste modo, ao comparar-se as proporções de detecção de *H. pylori* entre placa dental e saliva, observou-se existir uma concordância estatística significativa entre os resultados, apesar da fraca replicabilidade amostral (Kappa = 0,27) pela escala de Bernard Rosner (2006) apud Ayres et al. (2007) (Tabela 2).

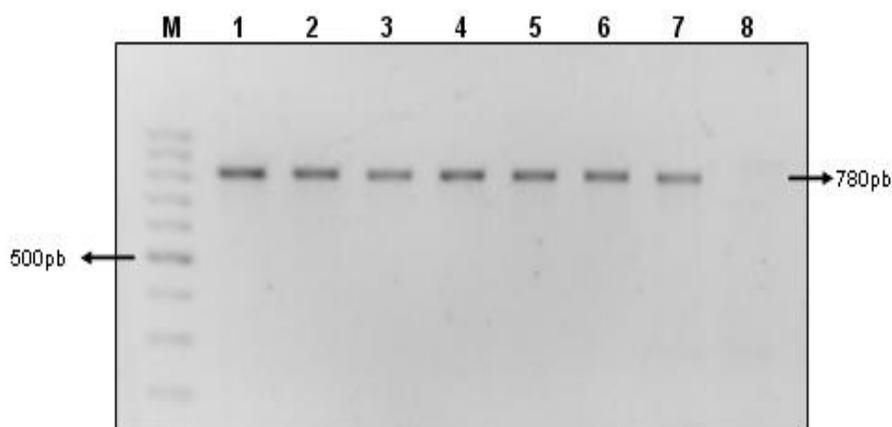


Figura 4. Ilustração do padrão de amplificação do gene *16S* do RNA ribossômico da *H. pylori* em gel de agarose 1%. “1 a 7” são amostras positivas, “8” o controle negativo e “M” o marcador de peso molecular (Fermentas 1000 pb).

Tabela 2. Distribuição do gene *16S RNAr* da *H. pylori* em amostras de saliva e placa dental entre os estudantes examinados.

Placa dental	Saliva		Total	Teste Kappa
	Positivo (%)	Negativo (%)		
Positivo	47 (68)	22 (32)	69	0,003
Negativo	14 (40)	21 (60)	35	
Total	61	43	104	

Na tabela 3 são apresentados os dados relativos à condição clínica bucal dos escolares. Na avaliação da cárie dentária, a mediana para o CPO-D foi de 3,53 (mínimo de 0 e máximo de 17), verificando-se também que 45,2% (47/104) do total

amostrado apresentavam valores médios de CPO-D maior que 3. Uma velocidade de fluxo salivar normal (>1 mL/min) foi observada em 83,6% (87/104) dos escolares e 94,2% (98,4%) tinham também capacidade tampão normal (pH final 5-7). Todos os indivíduos tinham *Lactobacillus* e *S. mutans* em suas salivas, entre eles, apenas 29,8% (31/104) tinham uma contagem de unidades formadoras de colônias de *Lactobacillus* > 10⁵, enquanto que esta categoria de UFC na contagem de colônias de *S. mutans* foi encontrada em 50% (52/104) da amostra.

Tabela 3. Avaliação Clínica da condição de saúde bucal de estudantes em Belém-Pará (2008).

Parâmetros Salivares		N (%)
Fluxo Salivar	Normal (>1 mL/min)	87 (83,6)
	Anormal (≤1 mL/min)	17 (16,4)
Capacidade tampão	Normal (pH final 5-7)	98 (94,2)
	Anormal (pH final <5)	06 (5,8)
<i>S. mutans</i>	UFC/mL ≤ 10 ⁵	52 (50)
	UFC/mL > 10 ⁵	52 (50)
<i>Lactobacillus</i>	UFC/mL ≤ 10 ⁵	73 (70)
	UFC/mL > 10 ⁵	31 (30)
Índice CPO-D	≤ 3	57 (54,8)
	> 3	47 (45,2)
Total		104

Em relação ao gênero, observou-se maior número de indivíduos do sexo feminino (59,6%) na amostra analisada, e cerca de 87% e 82% destas apresentaram cárie e *H. pylori* na cavidade oral, respectivamente. No sexo masculino, a bactéria *H.*

pylori foi encontrada na cavidade oral de 71,4% dos indivíduos e 76% apresentavam infecção de cárie. Estas diferenças não se mostraram estatisticamente significantes, ou seja, em relação ao gênero e a presença de cárie dental e ao gênero e a infecção por *H. pylori*.

Os escolares foram classificados quanto à faixa etária, de acordo com o Estatuto da Criança e do Adolescente (ECA) em: criança (até 11 anos), adolescente (de 12 a 18 anos) e adulto (> de 18 anos). Considerando tal distribuição, observou-se que na faixa etária de até 11 anos, a proporção de escolares apresentando contagem de colônias da bactéria cariogênica *S. mutans* com valores médios > 10⁵ UFC/mL eram significativamente menores do que aquela de escolares acima de 11 anos de idade ($X^2 = 8,027$; *p* valor = 0,0181).

Entretanto, a distribuição do número de colônias de *Lactobacillus* classificadas a partir dos valores > 10⁵ UFC/mL e ≤ 10⁵ UFC/mL, que foram observados em cerca de 30% (31/104) e 70% (73/104) dos escolares, respectivamente, não variaram significativamente ($X^2 = 2,434$; *p* valor = 0,2962) entre as diferentes faixas etárias (Gráfico 1).

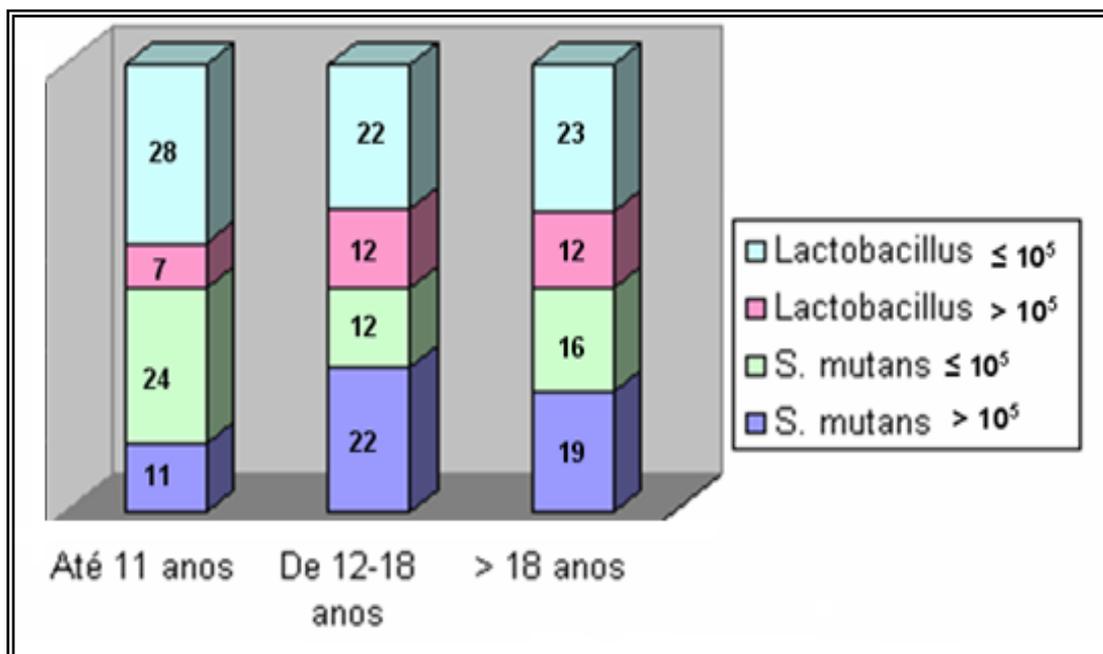


Gráfico 1. Relação entre idade e índice de *S. mutans* e *Lactobacillus* na cavidade oral de estudantes em Belém-Pará (2008).

Paralelamente, a análise dos dados segundo a idade mostrou que entre os escolares examinados a tendência é aumentar o número de experiência de cárie à medida que o indivíduo aumenta de idade ($X^2 = 5,8863$; $p \text{ valor} = 0,0153$). Por outro lado, houve uma tendência crescente de escolares com infecção pela *H. pylori* com a diminuição da faixa etária ($X^2 = 8,8648$; $p \text{ valor} = 0,0029$). Deste modo, a prevalência da infecção pela *H. pylori* foi mais elevada na 1ª infância, ou seja, entre os escolares de até 11 anos (Gráfico 2).

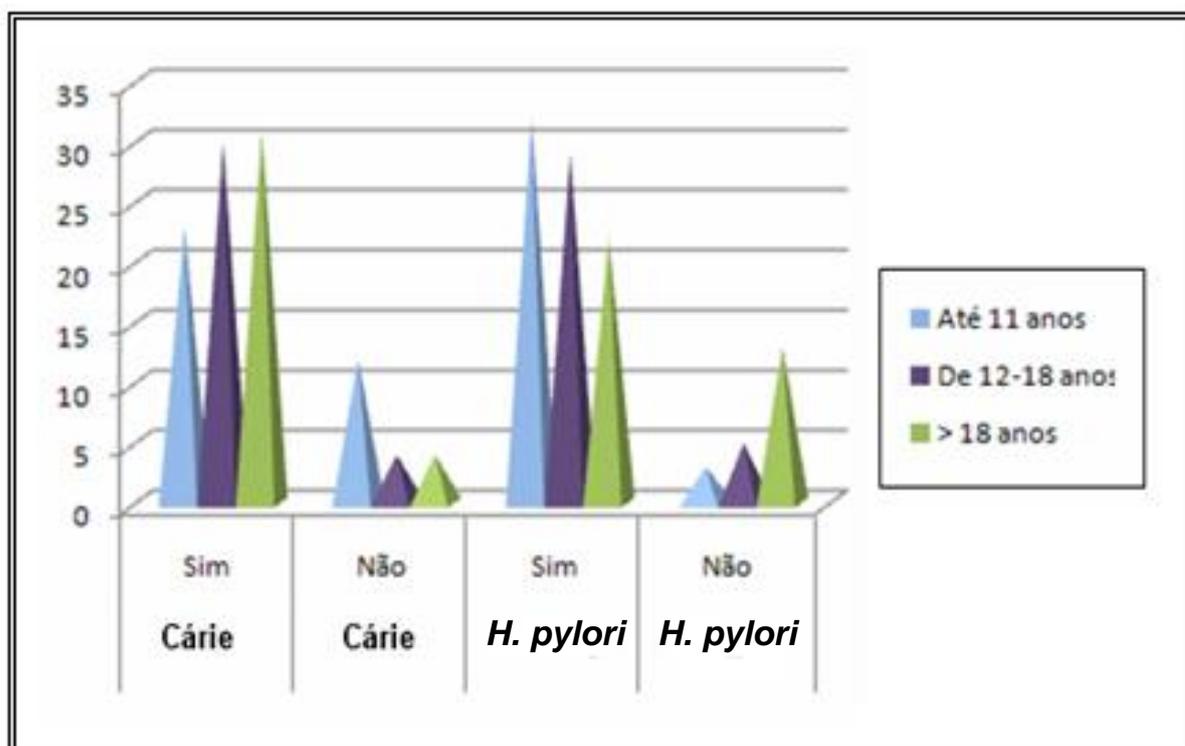


Gráfico 2. Relação entre idade em anos, cárie e *H. pylori* na cavidade oral de estudantes em Belém-Pará (2008).

Um modelo de regressão logística múltipla foi testado para cada um destes marcadores de risco, usando a experiência de cárie dicotomizada (positivo versus negativo) como variável dependente. Neste modelo a idade foi identificada como uma variável significativa, enquanto que a contagem de *S. mutans* e de *Lactobacillus*, o fluxo salivar, a capacidade tampão e o CPO-D não resultaram como variáveis significantes (Tabela 4).

Tabela 4. Modelo de Regressão Logística para marcadores de risco para cárie na cavidade oral de estudantes em Belém-Pará (2008).

Marcadores	Odds Ratio	Erro padrão	p- valor	IC 95%
Cárie		1.0444		
<i>S. mutans</i>	1.8301	0.6932	0.3833	0.47 a 7.12
<i>Lactobacillus</i>	0.2844	0.7986	0.1153	0.06 a 1.36
Fluxo salivar	0.4714	0.7880	0.3399	0.10 a 2.21
Capacidade tampão	0.7307	68.0164	0.9963	0.00 a infinito
CPO-D	57140.4655	23.8756	0.6464	0.00 a infinito
Idade	1.2041	0.0717	0.0096	1.05 a 1.39

Adicionalmente, após examinar a presença da *H. pylori* na cavidade oral foi também testado um modelo de Regressão Logística Múltipla incluindo as variáveis clínicas de saúde bucal e ainda, a experiência de cárie, utilizando a ausência ou presença de *H. pylori* como variável dependente. Neste modelo a única associação significativa observada foi com a idade (Tabela 5).

Tabela 5. Modelo de Regressão Logística para marcadores de risco para *H. pylori* na cavidade oral de estudantes em Belém-Pará (2008).

Marcadores	Odds Ratio	Erro padrão	<i>p</i> - valor	IC 95%
<i>H. pylori</i>	-	1.1914	-	-
<i>S. mutans</i>	2.3211	0.6042	0.1634	0.71 a 7.59
<i>Lactobacillus</i>	1.3928	0.6835	0.6279	0.36 a 5.32
Fluxo salivar	0.9591	0.7685	0.9566	0.21 a 4.33
Capacidade tampão	0.5573	1.0605	0.5814	0.07 a 4.45
Cárie	1.5582	0.8462	0.6002	0.30 a 8.18
CPO-D	0.7162	0.6233	0.5923	0.21 a 2.43
Idade	0.8087	0.0669	0.0015	0.71 a 0.92

Considerando as práticas de higiene oral da população (Tabela 6), a maioria dos indivíduos (74%) relatou escovar os dentes duas ou mais de duas vezes ao dia e não fazer uso de fio dental (76%). No que diz respeito ao número de visitas ao dentista por ano, 75% declararam visitar o dentista uma vez ou mais por ano. Nenhuma associação significativa foi encontrada com estas variáveis e a experiência de cárie. Por outro lado, o número de visitas ao dentista por ano mostrou relação positiva com a presença da bactéria *H. pylori* na cavidade oral.

Tabela 6. Práticas de higiene oral relacionadas à experiência de cárie e presença de *H. pylori* na cavidade oral de estudantes em Belém-Pará (2008).

Variáveis estudadas	n	Cárie		Teste Exato de Fisher	<i>H. pylori</i>		Teste Exato de Fisher
		+	-	<i>p</i> valor	+	-	<i>p</i> valor
Escovação/dia							
Uma vez	27	24	03	0,2668	24	03	0,2651
≥ 2 vezes	77	60	17		59	18	
Usa fio dental							
Sim	25	19	06	0,5621	18	07	0,3909
Não	79	65	14		65	14	
Visitas ao dentista/ano							
Nunca	26	23	03	0,3892	15	11	0,0034
1 vez ou mais	78	61	17		68	10	

As características socioeconômicas obtidas através de questionário epidemiológico, descritas na tabela 7, confirmaram que o grupo amostral pertence ao nível sócio econômico baixo, mostrando que a maioria dos indivíduos (56%) tinha renda familiar de até um salário mínimo. Os sujeitos investigados habitavam, em sua maioria (67%), em residências construídas de madeira e com mais de três moradores por residência (85,6%). A maioria dos indivíduos da pesquisa relatou ter banheiro construído de alvenaria (62%), possuir fossa asséptica (66%) e consumir água tratada (55%).

Nenhuma das variáveis supracitadas mostrou diferença estatisticamente significativa, quando relacionada à presença de cárie dental e da bactéria *H. pylori*

na cavidade oral. Somente quando se comparou o nível de escolaridade e positividade para a bactéria *H. pylori* na cavidade oral encontrou-se diferença significativa, verificando-se que quanto menor o nível de escolaridade, maior foi a positividade para a bactéria *H. pylori*.

Tabela 7. Características sócio-econômicas relacionadas à experiência de cárie e presença de *H. pylori* na cavidade oral de estudantes em Belém-Pará (2008).

Variáveis estudadas	Cárie		Teste Exato de Fisher	<i>H. pylori</i>		n	Teste Exato de Fisher
	+	-	<i>p</i> - valor	+	-		<i>p</i> - valor
Renda *							
≤1	50	08	0,1371	48	10	58	0,4649
2 ou mais	34	12		35	11	46	
Escolaridade							
Ensino Fundamental	53	15	0,4345	60	08	68	0,0048
Ensino Médio	31	05		23	13	36	
Tipo de residência							
Alvenaria	28	06	0,8001	28	06	34	0,7965
Madeira	56	14		55	15	70	
Nº de moradores/residência							
3	13	02	0,7300	12	03	15	1,0
Acima de 3	71	18		71	18	89	
Tipo de banheiro							
Alvenaria	56	16	0,2926	60	12	72	0,1945
Madeira	28	04		23	09	32	
Tipo de fossa							
Não-asséptica	31	04	0,1927	27	08	35	0,7965
Séptica	53	16		56	13	69	
Água tratada							
Não	36	11	0,4540	37	10	47	0,8114
Sim	48	09		46	11	57	

*(Salário mínimo)

4.1. DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS SANGUÍNEOS ABO e LEWIS, ESTADO SECRETOR ABH E GENOTIPAGEM DOS INDIVÍDUOS DE ACORDO COM O GENE *SECRETOR* ATRAVÉS DA PCR-RFLP.

A expressão dos antígenos de grupos sanguíneos ABO e Lewis e o estado secretor ABH foi realizada exclusivamente ao nível salivar (Figura 5). Entre os escolares, um total de 86 (83,7%) eram secretores de antígenos ABH e 18 (17,3%) eram não secretores dessas substâncias na saliva.

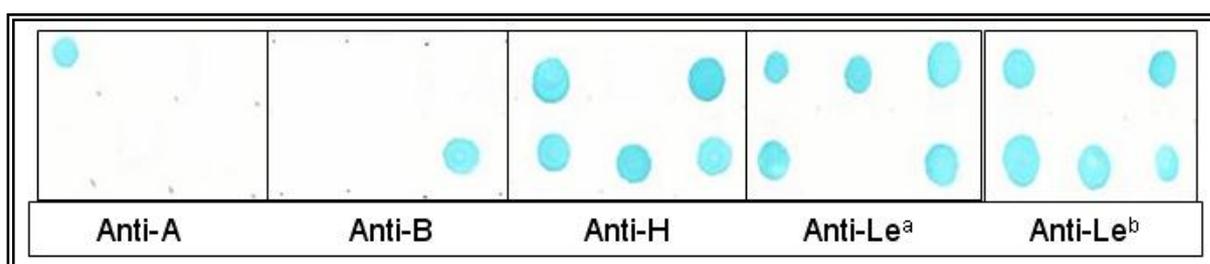


Figura 5. Caracterização fenotípica do estado secretor ABH dos fenótipos de grupos sanguíneos ABO e Lewis na saliva pela Técnica Dot-ELISA em membrana de nitrocelulose.

Para a genotipagem do gene *Secretor* (*FUT2*) foi amplificado um fragmento de 1170 pares de bases compreendendo a região codificadora do gene. Uma segunda reação de amplificação foi gerada para visualização de um fragmento de DNA de 107 pares de bases e um de 80 pares de bases, correspondendo às mutações G428A (*se*⁴²⁸) e A385T (*se*³⁸⁵), respectivamente.

Estes fragmentos foram tratados com as enzimas de restrição XbaI e AluI, resultando em fragmentos de 84 pb e 23 pb para a mutação G428A (Figura 6) e de 51 pb e 29 pb para a mutação A385T. Os produtos da digestão enzimática foram visualizados em gel de agarose 3% contendo brometo de etídio.

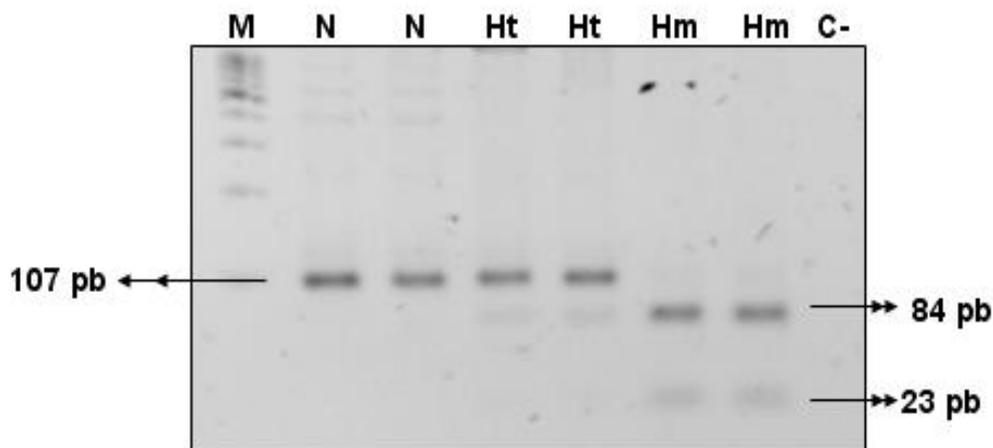


Figura 6. Padrão de digestão enzimática da mutação G428A pela enzima XbaI em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio. “M” é o marcador de peso molecular (Fermentas 1000 pb), “N” é o alelo selvagem, “Ht” indivíduo heterozigoto, “Hm” indivíduo homozigoto para a mutação e “C-” o controle negativo.

Entre os 86 indivíduos secretores, 17 foram heterozigotos para a mutação G428A com genótipo $Sese^{428}$, já entre os não secretores (17 Lewis a e um Lewis negativo) todos foram homozigotos, com genótipo $se^{428}se^{428}$. Os achados nesta amostra não detectaram a mutação A385T.

Em relação ao sistema de grupo sanguíneo ABO, em 18 (17,3%) dos indivíduos não foi possível determinar o fenótipo salivar. Entre os secretores (86), o grupo sanguíneo O, foi detectado em 47 (54,66%) dos indivíduos, sendo o mais freqüente na amostra, seguido pelo grupo A com 27 (31,39%). Os fenótipos B e AB apresentaram freqüência de 11 (12,79%) e 01 (1,16%), respectivamente.

Já no que diz respeito ao sistema de grupo sanguíneo Lewis observou-se a seguinte freqüência: 82 (79%) apresentaram o fenótipo Le (a-b+), 05 (5%) tiveram o fenótipo Le (a-b-) e 17 (16%) eram Le (a+b-). Entre os cinco indivíduos Le (a-b-), quatro apresentam substâncias ABH em sua saliva, o que caracteriza um estado

secretor. Como o número de escolares, agrupados entre as diferentes classes fenotípicas do sistema de grupos sanguíneos ABO investigados, foi pequeno, verificou-se a necessidade de reuni-los em apenas dois grupos, O e Não-O (A, B e AB). O sistema Lewis foi classificado em Le (a-b+), Le (a+b-) e Le (a-b-) e o estado secretor em secretor e não-secretor de substâncias ABH na saliva (Tabela 8).

Tabela 8. Distribuição dos fenótipos salivares ABO e Lewis, estado secretor em relação à presença de cárie, de *S. mutans* e *H. pylori* na cavidade oral de estudantes em Belém-Pará (2008).

Fenótipo	n	<i>S. mutans</i>		p valor	<i>H. pylori</i>		p valor
		> 10 ⁵	≤ 10 ⁵		Sim	Não	
ABO							
O	47	24	23	1,0 ¹	38	09	0,8575 ²
Não-O	39	19	20		30	09	
Lewis							
Le (a-b+)	82	41	41	0,8850 ³	64	18	0,3283 ⁴
Le (a+b-)	17	08	09		14	03	
Le (a-b-)	05	03	02		05	0	
Secretor ABH							
Secretor	86	43	43	0,7955 ⁵	68	18	0,9305 ⁶
Não-secretor	18	09	09		15	03	

1: $X^2 = 0,047$; 2: $X^2 = 0,199$; Teste-G (Williams) = 0,2443; 4: Teste-G (Williams) = 2,2277; 5: $X^2 = 0$; 6: Teste-G (Yates) = 0,0076.

A comparação entre a distribuição dos grupos sanguíneos ABO e Lewis, assim como, a caracterização fenotípica do estado secretor ABH com relação à experiência de cárie determinada pelo índice de unidades formadoras de colônias de *S. mutans* e também quanto à presença de *H. pylori* na cavidade oral dos escolares examinados não favoreceu a hipótese de existir diferenças significantes entre os grupos investigados.

5. DISCUSSÃO

A bactéria *H. pylori* é um importante patógeno gastrointestinal associado com gastrite, bem como, com úlcera gástrica ou duodenal e câncer gástrico (CZESNIKIEWICZ-GUZIK et al., 2005). A cavidade oral vem sendo considerada como um reservatório potencial para a infecção e re-infecção gástrica (ALLAKER et al.; BERROTERAN et al., 2002; DOWSETT & KOMOLIK; UMEDA et al., 2003).

Recentemente, no Iran a *H. pylori* foi encontrada em associação com a placa dental de pacientes com periodontite crônica, sugerindo que o ambiente oral é uma das rotas potenciais de transmissão do microrganismo (ESKANDARI et al., 2009). Gebara et al. (2006) estudaram indivíduos com periodontite crônica na cidade de São Paulo, e detectaram após tripla terapia, DNA da bactéria *H. pylori* em 10% e 60% das amostras de estômago e cavidade oral, respectivamente, mostrando que antibioticoterapia não foi tão eficiente contra o patógeno na boca, podendo esta ser considerada como um reservatório capaz de aumentar o risco de re-infecção gástrica.

A maioria dos estudos sobre *H. pylori* na cavidade oral têm seu foco na relação entre a presença da bactéria na boca e no estômago ou sua possível relação com vários tipos de doenças gástricas e doenças orais, como halitose, glossite (ADLER et al., 2005) e cárie dental (KOLHO et al., 2001). Por outro lado, Czesnikiewicz-Guzik et al. (2005) em um estudo comparativo entre amostras orais (placa e saliva) e do estômago, realizado em mulheres polonesas, não encontraram relação entre a presença da bactéria na cavidade oral e infecção gástrica.

No presente estudo, após análise dos dados verificou-se uma prevalência de 79,8% de *H. pylori* na cavidade oral, tendo frequência de 66,35% na placa dental e

de 58,65% na saliva da população amostrada, cujas proporções não diferiram significativamente.

Tiwari et al. (2005) obtiveram uma freqüência de 60% de amostras de saliva positivas para a *H. pylori* em sujeitos assintomáticos para doenças gástricas na Índia. Czesnikiewicz-Guzik et al. (2005) obtiveram em seu estudo prevalência de 54,1% de amostras de saliva positivas para *H. pylori*. Liu et al. (2009) encontraram uma prevalência de 59,4% de *H. pylori* na placa dental de chineses positivos para infecção no estomago.

Em outro estudo realizado na Alemanha, 97% dos pacientes com dispepsia foram positivos para *H.pylori* na placa dental, enquanto o DNA da bactéria foi detectado em somente 55% das amostras de saliva (SONG et al., 2000). Souto e Colombo (2008) detectaram *H pylori* em 20% das amostras de saliva e 33,3% das amostras de placa dental em um estudo realizado na cidade do Rio de Janeiro em pacientes assintomáticos para doenças gástricas.

Chitsazi et al. (2006) encontraram uma freqüência de 14% de *H. pylori* na placa dental de sujeitos sem infecção gástrica no Iran. Liu et al (2008) encontraram uma freqüência de 58,9% de *H. pylori* na placa dental de chineses, e destes 55,6% tinham cárie, eles sugeriram que a cavidade oral poderia ser um importante reservatório para a bactéria e que a *H. pylori* existente neste ambiente pode levar a ocorrência de doença bucal como a cárie e verificaram ainda que pessoas com má higiene bucal podem ser consideradas como tendo elevado risco para *H. pylori* na boca.

Já tem sido reportada diferença na prevalência de *H. pylori* entre amostras da cavidade oral. Song et al. (2000) observaram uma positividade de 55% de *H. pylori* na saliva e de 80% na placa dental de alemãs, verificando que a bactéria estava mais presente na placa, independente de infecção no estômago. Segundo estes

autores esta distribuição pode estar de acordo com as características microaerófilas da *H. pylori*, pode ocorrer devido a composição da placa dental que varia de sítio para sítio na cavidade oral, uma vez que observaram maior crescimento da bactéria na região dos dentes molares e também em resposta a várias influências orais.

Kignel et al. (2005) analisando 49 pacientes em São Paulo observaram uma frequência de 02% de *H. pylori* na placa dental e 0% na saliva, sugerindo que o sítio de localização da bactéria na cavidade oral pode influenciar na prevalência do microrganismo. Ao mesmo tempo, esta bactéria foi encontrada em diferentes amostras clínicas provenientes da cavidade oral, como placa dental e saliva, sem a presença de colonização em um destes nichos preferencialmente, posto que a grande diversidade de superfícies biológicas neste ambiente fornece muitos sítios apropriados para a colonização de uma variedade de espécies bacterianas.

Nossos resultados apóiam os dados mostrados na literatura, em geral de uma elevada prevalência, particularmente para populações de baixo nível sócio-econômico. Não foi observada diferença na prevalência da *H. pylori* entre os sexos, concordando com outros autores, os quais observaram que a relação entre a prevalência de colonização e o gênero não foi significativa (CHITSAZI et al., 2006; LIU et al., 2008; MEDINA et al.; LIU et al.; JIA et al., 2009).

Entre as características sócio-econômicas dos escolares, observou-se que não houveram diferenças significativas correlacionadas com as variáveis, renda familiar, tipo de habitação, número de moradores por residência, tipo de construção do banheiro, tipo de fossa e água para o consumo com a presença de *H. pylori* e cárie dental. Contudo os resultados obtidos indicaram que as variáveis grau de instrução e a faixa etária diferem significativamente entre escolares positivos ou negativos para *H. pylori*.

O nível de instrução tem sido considerado como um importante fator de risco para infecção pela *H. pylori*. Observou-se nesta análise que pessoas mais instruídas apresentavam-se menos infectadas. Já foi demonstrado que indivíduos com maior nível de instrução apresentavam menor risco para a infecção que pessoas com baixo nível ou sem nenhum grau de instrução (ZATERCA et al., 2007; NOURAIE et al., 2008).

O presente estudo observou maior prevalência de infecção por *H. pylori* entre os escolares de até 11 anos, corroborando com dados que demonstraram que a infância vem a ser o período de maior aquisição da infecção nas populações (MALATY et al., 2007; BARILE et al., 2009). Já foi demonstrado que a infância constitui o período de maior aquisição da *H. pylori* e que as taxas de prevalência da infecção aumentam com a idade (ZATERKA et al., 2007). Um estudo realizado em Belém-Pa mostrou prevalência elevada, acometendo cerca de 80% dos indivíduos na faixa etária de 06 meses a 12 anos de idade (SILVA, 2003). Outra análise realizada em Belém verificou uma prevalência de 84,81% em crianças com faixa etária de 1 a 12 anos (GUIMARÃES, 2007).

O *S. mutans* é o organismo mais prevalente na placa dental sendo encontrado com maior frequência na cavidade oral de indivíduos com alta atividade de cárie (FRANCO E FRANCO et al., 2007). Segundo Shivakumar et al. (2009) existe uma forte associação entre o nível de colonização com *S. mutans* e cárie dental.

De acordo com Smiech-Slomkowska & Jablonska-Zrobek (2007) a presença de 10^6 UFC/mL de saliva representa o número indicativo de atividade de cárie acentuada, contudo, no presente estudo, utilizou-se como parâmetro os valores $\leq 10^5$ e $> 10^5$ UFC/mL para medir o índice desta bactéria segundo instruções do fabricante do kit CRT-Bactéria (Ivoclar Vivadent).

Observou-se uma prevalência elevada (80,7%) de cárie de nos escolares investigados, em países em desenvolvimento a prevalência pode chegar a 90%. Sabe-se que o aumento da incidência da cárie é determinado pelo aumento dos *Streptococcus* do grupo *mutans* e/ou por alterações na homeostasia salivar (SPOLIDORIO et al., 2001).

Assim, dados obtidos a partir de estudos longitudinais mostraram que indivíduos com níveis elevados de *S. mutans* na saliva apresentam atividade de cárie mais acentuada do que indivíduos com baixos níveis (CORTELLI et al., 2004). Este estudo basicamente foi constituído de um grupo de escolares na faixa etária menor que 12 anos, escolhido para refletir a saúde oral e um segundo grupo ≥ 12 anos para comparar e monitorar a tendência da doença.

No primeiro grupo encontrou-se uma freqüência de 65,7% de cárie e no segundo de 88,4%, indicando uma elevada prevalência da doença na infância e conseqüentemente a saúde bucal encontra-se em condições precárias, que se pode constatar pela prevalência crescente da cárie no segundo grupo. No conjunto desta análise por faixas etárias a elevada proporção de crianças com cárie denota a necessidade dos cuidados e tratamento na prevenção das doenças dentais na população infanto-juvenil.

Portanto, os resultados mostraram que a experiência de cárie tende a aumentar conforme aumenta a idade do indivíduo e que nos escolares com idade acima de 11 anos foi verificado um maior número de colônias de *S. mutans* com valor $> 10^5$ UFC/mL, dado interessante, uma vez que não foi evidenciada uma relação significativa entre a quantidade de *S. mutans* na cavidade oral e a presença de cárie, evidenciando-se que a experiência de cárie ocorreu mesmo quando o número de UFC/mL de *S. mutans* encontrado estava abaixo destes valores críticos.

Al Mulla et al. (2009) estudando fatores de risco para cárie na Suécia, demonstraram que indivíduos com baixos níveis de *Lactobacillus* na cavidade oral, também apresentavam baixos níveis de cárie. Em nosso estudo, apesar da alta prevalência de cárie, a maioria dos escolares apresentou contagem de colônia de *Lactobacillus* $\leq 10^5$ UFC/mL, mostrando não haver uma relação direta entre uma elevada quantidade de *Lactobacillus* na cavidade oral e o aumento de cárie dental.

Considerando os dados estudados, o valor médio do índice CPO-D da população foi de 3,53. De acordo com um levantamento realizado pelo Ministério da Saúde em várias capitais brasileiras no período de 2002/2003, o CPO-D encontrado na região Norte foi de 3,1. Para o ano de 2010 as metas da saúde bucal são de CPO-D menor que 1 aos 12 anos de idade (CORTELLI et al., 2004). O índice médio obtido mostra que não houve redução no CPO-D considerando-se a região Norte. Sabe-se que valores elevados de CPO-D indicam más condições de saúde bucal da população, freqüentemente associadas a condições socioeconômicas desfavoráveis, a dificuldade de acesso aos serviços odontológicos, ao consumo excessivo de açúcares (principalmente sacarose), além de limitado acesso ao flúor.

O controle de fatores relacionados com o desenvolvimento e progressão da doença de cárie, como presença de microrganismos específicos, bem como a condição sócio-econômica e hábitos dos indivíduos é de fundamental importância para se obter uma redução significativa nos níveis de CPO-D. É importante lembrar que no presente estudo o valor médio obtido incluiu indivíduos de diferentes faixas etárias e de um mesmo nível sócioeconômico.

Os fatores salivares, determinação da velocidade de fluxo salivar e capacidade tampão estão correlacionados com o aumento de microrganismos na saliva, por exemplo, quando a taxa de secreção salivar é baixa espera-se aumento do acúmulo de placa bacteriana (SPOLIDORIO et al., 2001). No entanto nesta

análise foi verificada ausência de relação entre o número dos microrganismos cariogênicos estudados (*S. mutans* e *Lactobacillus*) e os fatores salivares. Ainda em relação aos parâmetros salivares constatou-se que nem a capacidade tampão e nem a velocidade de fluxo salivar tem influência sobre a experiência de cárie, diferentemente do que foi descrito por Soriano et al. (2002).

Os resultados obtidos neste estudo, referentes às práticas de higiene oral, indicaram que somente o número de visitas ao dentista por ano difere significativamente quando relacionado com *H. pylori*. Interessante, mas não significativo, é que a frequência de cárie nos sujeitos que declararam visitar o dentista uma vez ou mais por ano não foi baixa (61/78), mas a condição bucal encontrada sugere a necessidade de supervisão adequada da técnica de escovação empregada.

Além da prevalência da *H. pylori* estar relacionada com fatores ambientais e sócio-econômicos, tem sido demonstrado uma associação da bactéria com fatores do hospedeiro como os grupos sanguíneos, podendo estes mediar a interação do patógeno com o hospedeiro, estando associados à susceptibilidade ou resistência a algumas doenças.

Tem sido sugerido que os antígenos Lewis estão implicados na infecção pela *H. pylori* principalmente o antígeno Le^b (SOEJIMA et al., 2009). Já foi observado que pessoas com grupo sanguíneo do tipo O têm mais receptores para *H. pylori* na mucosa gástrica que pessoas de outros tipos sanguíneos ABO (OBERHUBER et al., 1997). Adicionalmente, o risco para doenças vem sendo associado com o estado secretor ABH dos indivíduos (LIGTEMBERG et al., 2000).

Neste estudo observou-se que as frequências dos fenótipos de grupos sanguíneos de indivíduos infectados e não-infectados por *H. pylori*, não diferem entre si, sugerindo não existir uma associação estatisticamente significativa com a

infecção, o que não permite reforçar a hipótese sobre a presença de características genéticas do hospedeiro como os antígenos H e Leb como receptores de aderência bacteriana. Adicionalmente, não foi verificada nenhuma relação positiva entre a presença da bactéria *S. mutans* na cavidade oral e o genótipo homocigoto para a mutação do alelo inativo G428A, ou seja, indivíduos do fenótipo não-secretor ABH e Le(a+b-), parecendo não haver uma íntima relação entre este marcador inerente ao hospedeiro e um risco maior para a aquisição de cárie dental.

Deve ser mencionado, que os resultados mostraram uma incidência de indivíduos não secretores (sese) de substâncias ABH em suas salivas de 18,7%, próxima do que já foi descrito na literatura para não secretores, que é de aproximadamente 20% em várias populações caucasóides (SOEJIMA & KODA, 2008). O polimorfismo G428A é detectado como principal responsável pelo estado não secretor em diversas populações caucasóides, iranianas e africanas (SOEJIMA et al.; SOEJIMA & KODA; 2008).

A mutação G428A, que ocasiona perda funcional da enzima FUT2, foi identificada em 100% dos indivíduos da amostra, que eram não secretores (Lea). Contrariamente não foi detectada a mutação de sentido trocado A385T, também responsável pela perda da atividade de enzima FUT2. A referida mutação é predominante em populações asiáticas (SOEJIMA et al., 2008).

É interessante ressaltar, que o pequeno número amostral analisado no estudo possa ter sido a provável razão do desvio, que interferiu na significância estatística, e desde que estas associações não puderam ser confirmadas pelos resultados do presente estudo, estudos adicionais são necessários para melhor esclarecer e complementar a existência de fatores de predisposição genética ao desenvolvimento da cárie e colonização pela *H. pylori*.

A alta prevalência de *H. pylori* encontrada na cavidade oral dos escolares parece apontar que a boca é um nicho para a colonização da bactéria, podendo contribuir para a infecção e re-infecção do estômago. Paralelamente, os escolares investigados demonstraram índices elevados de cárie dental, o que é compatível com uma higiene oral inadequada e que poderia explicar a atividade de colonizadores tais como os *Streptococcus* e outros microrganismos que favorecem o processo de co-agregação, com colonização pela *H. pylori* na cavidade oral. Esperava-se em princípio, a ocorrência de uma associação entre os parâmetros socioeconômicos dos voluntários e a atividade de cárie, no entanto, os achados deste estudo demonstraram alta prevalência de cárie na população estudada sem relação com as variáveis selecionadas, provavelmente pelo fato de ter se analisado apenas um grupo socioeconômico. Este fato mostra a complexidade e a dificuldade de se tentar explicar a doença cárie dentária através de fatores mais gerais como as condições socioeconômicas e os hábitos comportamentais e de saúde.

6. CONCLUSÕES

- A prevalência de *H. pylori* e cárie dental na cavidade oral dos escolares investigados foram elevadas, enfatizando que infecções deste tipo constituem-se como problemas de saúde pública.
- As frequências encontradas de *H. pylori* na placa dental e na saliva da população amostrada foram similares, não mostrando haver um sítio preferencial de colonização da bactéria na cavidade oral.
- A experiência de cárie tende a aumentar a medida que cresce a idade do indivíduo.
- Não houve associações significativas entre as variáveis sócio-econômicas investigadas (renda familiar, tipo de habitação, número de moradores por residência, tipo de construção do banheiro, tipo de fossa e água para o consumo dos escolares) e a presença de cárie dental e *H. pylori* nos indivíduos investigados.
- A presença de *H. pylori* e cárie dental na cavidade oral não mostraram relação com o gênero dos escolares.
- Os indivíduos com menor nível de instrução e com idade de até 11 anos apresentaram-se mais infectados por *H. pylori* na cavidade oral.

- Nenhuma associação foi observada entre as variáveis relativas às práticas de higiene oral e as infecções investigadas, excetuando-se o número de visitas ao dentista por ano que controvertidamente mostrou-se inversamente relacionada com taxa de infecção pela *H. pylori* na cavidade oral.
- Os parâmetros de avaliação clínica dos estudantes investigados não mostraram relação com a experiência de cárie e infecção por *H. pylori*.
- O valor médio de CPO-D encontrado na população estava acima do valor crítico esperado pela OMS.
- A análise de associação utilizando o estado secretor ABH e Lewis como marcadores de susceptibilidade genética não permitiu confirmar a sua relação como fatores predisponentes para as infecções causadas por *H. pylori* e/ou *S. mutans*.

REFERENCIAS

ADLER, I., DENNINGHOFF, V. C., ALVAREZ, M. I., AVAGNINA, A., YOSHIDA, R.; ELSNER, B. *Helicobacter pylori* associated with glossitis and halitosis. **Helicobacter**, v. 10, p. 312–17, 2005.

AGUIAR, D. C. F., CORVELO, T. C., ARAÚJO, M., CRUZ, E. M., DAIBES, S.; ASSUNÇÃO, M. B. Expressão dos antígenos ABH e Lewis na gastrite crônica e alterações pré-neoplásicas da mucosa gástrica. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 39, p. 222-32, 2002.

AJDIĆ, D., MCSHAN, W. M., MCLAUGHLIN, R. E., SAVIĆ, G, CHANG, J, CARSON, M. B.,PRIMEAUX C., TIAN, R., KENTON S., JIA. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 22, p. 14434–39, 2002.

ALLAKER, R. P., YOUNG, K. A., HARDIE, J. M., DOMIZIO, N., MEADOWS, N. J. Prevalence of *Helicobacter pylori* oral and gastrointestinal sites in childrens: evidence for possible oral-to-oral transmission. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, p. 312-17, 2002.

AL-MULLA, A. H., KHARSA, S. A., KJELLBERG, H., BIRKHED, D. Cáries risk profiles in orthodontic patients at follow-up using cariogram. **Angle Orthodontists**, v. 79, n. 2, p. 323-30, 2009.

ALMSTAHL, A. & WIKSTROM, M. Oral microflora in subjects with reduced salivary Secretion. **Journal of Dental Research**, v.78, n. 8, p. 1410-16, 1999.

AREIAS, C., MACHO, V., FRIAS-BULHOSA, J., GUIMARÃES, H., ANDRADE, C. Saúde oral em pediatria. **Acta Pediátrica Portuguesa**, v. 39, n. 4, p. 163-70, 2008.

ALMEIDA, P. F., FRANÇA, M. P., SANTOS, S. P., MOREIRA, R. S. & TUNES, U. R. Microbiota estreptocócica associada com a formação inicial da placa dental.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Salvador, v. 1, p. 33-41, 2002.

AMIEVA, M. R., EL-OMAR, E. M. Host bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterology**, v. 134, p. 306-23, 2008.

ATHERTON, J. C. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. **Journal of Gastroenterology and hepatology**, v. 40, p. 701-03, 1997.

AVCU, N., AVCU, F., BEYAN, C. URAL, A., KAPTAN, K. & OZYURT, M. The relationship between gastric-oral *Helicobacter pylori* and oral hygiene in patients with vitamin B-12 deficiency anemia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 92, p. 166-69, 2001.

AYRES, M.; AYRES, J. R. M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. **Sociedade Civil Mamirauá - CNPq**, 2007.

BARILE, K. A. S. MARTINS, L. C., AMARAL, R. K. C., LOIOLA, R. S. P., CORVELI, T. C. O. Prevalência da infecção por *Helicobacter pylori* em crianças e mães na Região Norte do Brasil. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 11, n. 4, p. 6-12, 2009.

BEIGHTON, D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 33, p. 248-55, 2005.

BENNEDETO, M. S. **Proposta de um Método Prático para a Avaliação do Poder de Neutralização Existente na Cavidade Bucal**. Dissertação de Mestrado, USP, 2002.

BERROTERAN, A., PERRONE, M., CORRENTI, M., CAVAZZA, M., TOMBAZZI, C. & GONZÁLEZ, R. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the oral cavity and

gastroduodenal system of a Venezuelan population. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, p. 764-69, 2002.

BETTERIDGE, A. & WATKINS, W. H. Variant forms of α -2-L-fucosyltransferase in human submaxillary glands from blood group ABH “secretor” and “nonsecretor” individuals. **Glycoconjugate Journal**, v. 2, p. 61–78, 1986.

BÓREN, T.; NORMARK; S. FALK, P. *Helicobacter pylori*: molecular basis for host recognition and bacterial adherence. **Trends in Microbiology**, v. 2, n. 7, p. 221-28, 1994.

CALFIELD, P. W. & GRIFFEN, A. L. Dental Caries: un infections and transmissible disease. **Pediatric Clinics of North America**, v. 47, n. 5, p. 1001-19, 2000.

CAN, F., KARAHAN, C., DOLAPEI, I., DEMIRBILEK, M., TEKELI, A.; ARSLAN, H. Urease activity and Ure gene sequencing of coccoid forms of *H. pylori* induced by different factors. **Current Microbiology**, v. 56, p.150-55, 2008.

CHATTOPADHYAY, S., RAJASHREE, P., RAMAMURTHY, T., CHOWDHURY, A., SANTRA, A., DHALI, G. K., BHATTACHARYA, S. K., BERG, D. E., NAIR, G. B.; MUKHOPADHYAY. Multiplex PCR Assay for rapid detection and genotyping of *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2821-24, 2004.

CHITSAZI, M. T. FATTHAI, E., FARAHANI, R. M. Z.; FATAHI, S. *Helicobacter pylori* in the dental plaque: Is it of diagnostic value for gastric infection? **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 11, p. 325-28, 2006.

CIOPRAGA, J. MOTAS, C.; DOYLE, R. J. Inhibition of saliva-induced oral streptococcal aggregation by blood group glycoproteins. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 145-49, 1995.

CLINE, M., DOLAN, B.; REEVES, E. P. Bacterial factors that mediate colonization of the stomach and virulence of *Helicobacter pylori*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 268, p. 135-43, 2007.

CORTELLI, S. C., CORTELLI, J. R., PRADO, J. S., AQUINO, D. R.; JORGE, A. O. DMFT in school children relate to caries risk factors. **Ciencia Odontológica Brasileira**, v. 7, n. 2, p. 75-82. 2004.

CZESNIKIEWICZ-GUZYK, M., BIELANSKI, W., GUZYK, T. J., LOSTRE, B., KONTUREK, S. J. *Helicobacter pylori* in the oral cavity and its implications in gastric infection, periodontal health, immunology and dyspepsia. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 77-89, 2005.

CYPRIANO, S., SOUSA, M. L. R., WADAB, R. S. Avaliação de índices CPO-D simplificados em levantamentos epidemiológicos de cárie dentária. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n.2, p. 285-92, 2005.

D'ALESSANDRO, A. & SERI, S. Comparison of three different methods for evaluation of *Helicobacter pylori* in human dental plaque. **Bollettino Societa Italiana Biologia Sperimentale**, v. 68, n. 12, p. 769-73, 1992.

DANIELS, G. **Human blood groups**. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science; p. 8-120, 2002.

DIAS, J. C. & PAUL, N. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 74, p. 287-90, 2007.

DOWSETT, S. A., ARCHILA, L., SEGRETO, V. A., GONZALES, C. R., SIUA, A., VASTOLA, K. A., BARTIZEK, R. D., KOLOWIK, M. J. *Helicobacter pylori* INFECTION IN INDIGENOUS FAMILIES OF Central América: serostatus and oral and fingernail carriage. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.2456 - 60, 1999.

DOWSETT, S. A. & KOLOWIK, M. J. Oral *Helicobacter pylori*: can we stomach it? **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v.14, n. 3, p. 226-33, 2003.

ESKANDARI, A., MAHMODPOOR, A., ABOLFAZLI, N., LAFZI, A. Detection of *Helicobacter pylori* using PCR in dental plaque of patients with and without gastritis. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, 2009.

FERGUSON, D. A., LI, C., PATEL, N. R., MAYBERRY, W. R., CHI, D. S. & THOMAS, E. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 2802-04, 1993.

FERNANDES, F. R. C. *et al.* Compensatory levels of salivary IgM anti-*Streptococcus mutans* antibodies in IgA-deficients patients. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 5, n. 3, p. 151-55, 1995.

FRANCO E FRANCO, T. C. C., AMOROSO, P., MARIN, J. M.; ÁVILA, F. A. Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples from Brazilian preschool children by Polymerase Chain Reaction. **Brazilian Dental Journal**, v. 18, n. 4, p. 2007.

GEBARA, E. C. E., PANNUTI, C., FARIA, C. M., CHEHTER, L., MAYER, M. P. A.; LIMA, L. A. P. A. Prevalence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity after systemic eradication therapy. **Oral Journal of Clinical and Periodontology**, v. 33, p. 329-33, 2006.

GEBARA, E. C. E., FARIA, C. M., PANNUTI, C., CHEHTER, L., MAYER, M. P. A.; LIMA, L. A. P. A. Persistence of *Helicobacter pylori* detected by polymerase chain reaction in the oral cavity of periodontitis patients. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, p. 277-280, 2004.

GROSSI, S. G. Ataque da placa dental: conexão entre doença periodontal, doença cardíaca e diabetes melito. **Compendium**, v. 22, n. 1, p. 15-24, 2000.

GUIMARÃES, V. S. Detecção da *Helicobacter pylori* através da técnica de reação em cadeia da polimerase em amostras fecais de crianças da cidade de Belém-Pará. Dissertação de mestrado. Belém-Pa, p. 98, 2007.

HERZBERG, D. L. & KAPLAN, E. L. **Streptococcal Infection**. Oxford Univ. Press, New York, p. 333-70, 2000.

HOGG, S. D. & EMBERY, G. Blood-group-reactive glycoprotein from human saliva interacts with lipoteichoic acid on the surface of *Streptococcus sanguineus* cells. **Archives of Oral Biology**, v. 27, p. 261-68, 1982.

HOSHINO, T., KAWAGUCHI, M., SHIMIZU, N., HOSHINO, N.; OOSHINA, T. & FUJIWARA, T. PCR Detection and identification of oral *Streptococci* in saliva samples using get genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious disease**, v. 48, p. 195-99, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER - INCA. **Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. RJ, 2003**. Disponível em: <http://inca.gov.br/estimativa/2003>. Acesso em 16 de junho de 2008.

JIA, C., JIANG, G., LI, C., LI, C. R. Effect of Dental Plaque Control on Infection of *Helicobacter pylori* in Gastric Mucosa. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 10, p. 1606-09, 2009.

KAMAROSKI, C., BARSZCSZ, C., ITO, E., ROSA, R.; ROSA, E. Social, salivary and microbiological factors associated to previous experiences of dental caries. **Revista de Clínica e Pesquisa Odontológica**, v. 2, n. 1, p. 27-37, 2005.

KELLY, R. J., ROUQUER, S., GIORGI, D. LENNON, G. G.; LOWE, J, B. Sequence and expression of a candidate for the human secretor blood group alpha(1,2)-fucosyltransferase gene (FUT2): Homozigosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 9, p. 4640-49, 1995.

KHOELER, C. I., MUES, M. B., DIENES, H. P., KRIEGSMANN, J., SCHIRMACHER, P.; ODONTAL, M. *Helicobacter pylori* genotyping in gastric adenocarcinoma an MALT lymphoma by multiplex PCR analyses of paraffin wax embedded tissues. **Journal Clinical Pathology**, v. 56, p. 36-42, 2002.

KIGNEL, S., PINA, F. A., ANDRÉ, E. A., MAYER, M. P. A.; BIRMAN, E. G. Occurrence of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva of dyspeptic patients. **Oral Microbiology**, v. 11, 17-21, 2005.

KILMARTIN, C. M. Dental Implications of *Helicobacter pylori*. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 68, n. 8, p. 489-93. 2002.

KODA, Y., SOEJMA, M. U.; KMURA, H. Molecular basis for secretor type alpha(1,2)-fucosyltransferase gene deficiency in a japanese population: a fusion gene generated by unequal crossover responsible for the enzyme deficiency, **American Journal of Human Genetics**, v. 59, n. 2, p. 343-50, 1996.

KODAIRA, M. S., ESCOBAR, A. M. U.; GRISI, S. Aspectos epidemiológicos da *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 356-69, 2002.

KOHLER, B., BRATTHALL, D.; KRASSE, B. Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in their infants. **Archives of Oral Biology**, v. 28, n. 3, p. 225-31. 1983.

KOLHO, K. L., HOLTTA, P., ALALUUSUA, S., LINDAHL, H., SAVILAHTI, E.; RAUTELIN, H. Dental caries is common in finish children infected with *Helicobacter pylori*. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 33, p. 815-7, 2001.

KRAJDEN, S., FUKSA, M., ANDERSON, J., KEMPSTON, J., BOCCIA, A., PETREA, C., *et al.* Examination of human stomach biopsies, saliva and dental plaque for *Campylobacter pylori*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 27, p. 1397-98, 1989.

KUDO, T., IWASAKI, H., NISHIHARA, S., SHINYA, N., ANDO, T., NARIMATSU, I.; NARIMATSU, H. Molecular genetic analysis of the human Lewis histo-blood group system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 16, p. 9830-37, 1996.

LADEIRA, M. P. S., SALVADORI, D. M. F.; RODRIGUEZ, M. A. M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 335-42, 2003.

LAMONT, R. J., DEMUTH, D. R., DAVIS, C. A., MALAMUD, D.; ROSAN, B. Salivary-agglutinin-mediated adherence of *Streptococcus mutans* to early plaque bacteria. **Infection Immunology**, v. 59, n. 10, p. 3446-50, 1991.

LANG, N. P. Placa e cálculos dentais. In: LINDHE, J. I. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. RJ: Guanabara Koogan, p. 66-89, 1997.

LIGTENBERG, A. J., VEERMAN, E. C., GRAAF, J.; AMERONGEN, A. V. Saliva-induced aggregation of oral *Streptococci* and the influence of blood group reactive substances. **Archives of Oral Biology**, v. 35, p.141-43, 1990.

LIGTENBERG, A. J., VEERMAN, E. C., AMERONGEN, A. A role for Lewis a antigens on salivary agglutinin in binding to *Streptococcus mutans*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 71, n. 1, p. 21-30, 2000.

LIU, Y., LIN, H., BAÍ, Y., QIN, X., ZHENG, X., SUN, Y.; ZHANG, Y. Dental plaque and the occurrence of dental caries or oral hygiene index. **Helicobacter**, v. 13, p. 256-60, 2008.

LIU, Y., YUE, H. LI, A., WANG, J., JIANG, B. O., ZHANG, Y., BAÍ, Y. An epidemiologic study on the correlation between oral *Helicobacter pylori* and gastric *Helicobacter pylori*. **Current Microbiology**, v. 58, p. 449-53, 2009.

LÓPEZ-BREA, M., ALARCO'N, T., DOMINGO, D.; DÍAZ-REGAÑÓN. Inhibitory effect of Gram-negative and Gram-positive microorganisms against *Helicobacter pylori* clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 139–42, 2008.

LOSTER BW, MAJEWSKI SW, CZEŚNIKIEWICZ-GUZIŁ M, BIELANSKI W, PIERZCHALSKI, P., KONTUREK S. J. The relationship between the presence of

Helicobacter pylori in the oral cavity and gastric in the stomach. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, n. 3, p. 91-100, 2006.

MAJMUDAR, P., SHAH, S. M., DHUNJBHOY, K. R.; DESAI, H. G. Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaques in healthy volunteers. **Indian Journal Gastroenterology**, v. 9, p. 271-72, 1990.

MALATY, H. M. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.21, n. 2, p. 205-14, 2007.

MAPSTONE, N. P., LYNCH, D. A. F., LEWIS, F. A., AXON, A. T. R., TOMPKINS, D. S., DIXON, M. F., *et al.* Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. **Journal of Clinical Pathology**, v. 46, p. 540-543, 1993.

MARTINS, L. C., CORVELO, T. C. O., OTI, H. T., C. F.; BARILE, K. A. S., Soroprevalência de anticorpos contra antígeno cagA do *H. Pylori* em indivíduos com úlcera gástrica na região Norte do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 307-10, 2002.

MEDINA, M. L., MEDINA, M. G., MARTÍN, G. T., PICÓN, S. O., BANCALARI, A.; MERINO, L. A. Molecular detection of *H. pylori* in oral samples from patients suffering digestive pathologies. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, 2009.

MEURMAN, J. H., PYHÖNEN, S., TEERENHOVI, L., LINDQVIST. Oral sources of septicemia in patients with malignancies. **Oral Oncology**, v.33, n. 6, p.389-97, 1997.

MEURMAN, J. H. & STAMATOVA, I. Probiotics: contributions to oral health. **Oral Diseases**, v. 13, p. 443-51, 2007.

MIZOBE-ONO, L., ARAÚJO, J. L. P., SANTOS, M. C. Componentes das imunidades inata e adaptativa presentes na saliva humana. **Revista de Odontologia da UNESP**, 2006; v. 35, n. 4, p. 253-261, 2006.

MOBLEY, H. L. T., MENDZ, G. L.; HAZELL, S. L. *Helicobacter pylori*: Physiology and genetics. **American Society for Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 3842-50, 2001.

MOOR-JANKOWSKI J. & WIENER A. S. Blood group antigens in primate animals and their relation to human blood groups. **Primates in medicine**, v. 3, p. 64-77, 1969.

MOMOSE, D. R., NEVES, A. C. C., PATROCÍNIO, M. C.; JORGE, A. O. C. Quantification of *Streptococci* of the group *mutans* in children bearers of extrinsic stains in the teeth. **Revista Biociência**, v. 9, n. 4, p. 53-58, 2003.

MORALES-ESPINOSA, R., FERNANDEZ-PRESAS, A., GONZALES-VALENCIAZ, G., FLORES-HERNANDEZ, S., DELGADO-SAPIEN, G., MENDEZ-SANCHEZ, J. L. *Helicobacter pylori* in the oral cavity is associated with gastroesophageal disease. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 24, p. 464-68, 2009.

MOTTA, L. J., GUEDES, C. C., REDA, S. H., BUSSADORI, S. K., FERNANDES, K. S. P., MARTINS, M. D. Vacinas anti-cárie: uma revisão do estágio atual. **ConScientiae Saúde**, v. 5, p. 97-107, 2006.

NAMIOT, D. B., NAMIOT, Z., KEMONA, A., BUCKI, R.; GOTEBIEWSKA. Oral health status and oral hygiene practices of patients with peptic ulcer and how these affect *Helicobacter pylori* eradication from the stomach. **Helicobacter**, v. 12, p. 63-67, 2007.

NAPIMOGA, M. H., HÖFLING, J. F., KLEIN, M. I., KAMIYA, R. U.; GONÇALVES, R. B. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. **Journal of Oral Science**, v. 47, n. 2, p. 59-65, 2005.

NOMURA, H.K, MIZUGUCHI, S., NOMURA, K. **Blood group antigens and cells adhesion**. Kyushu University, PRESTO, JST, 1998. Disponível em: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/glycoprotein/GPA04E.htm>. Acesso em: 22/02/2008, 22h.

NOURAIE, M., LATIF-NAVID, S., REZVAN, H., RADMARD, A., ZAER-REZAI, H., AMINI, S., SIAVOSHI, F., MALEKZADEH, R. Childhood hygienic practice and family education status determine the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Iran. **Helicobacter**, v. 14, p. 40-46, 2009.

OBERHUBER, G., KRANZ, A., DEJACO, C., DRAGOSICS, B., MOSBERGER, I., MAYR, W., RADASZKIEWICZ, T. Blood groups Lewis(b) and ABH expression in gastric mucosa: lack of inter-relation with *Helicobacter pylori* colonisation and occurrence of gastric MALT lymphoma. **Journal of Gastroenterology and hepatology**, v. 41, p. 37-42, 1997.

O'DONELL, J., MILLE-BAKER, B., LAFFAN, M. Human umbilical vein endothelial cells differ from other endothelial cells in failing to express ABO blood group antigens. **Journal of Vascular Research**, v. 37, p. 540-47, 2000.

OHO, T., YU, H., YAMASHITA, Y.; KOGA, T. Binding of salivary glycoprotein-secretory immunoglobulin A complex to the surface protein antigen *Streptococcus mutans*. **Infection Immunology**, v. 66, n. 1, p. 115-21, 1998.

OKUDA, K., ISHIHARA, K., MIURA, T., KATAKURA, A., NOMA, H., EBIHARA, Y. *Helicobacter pylori* may have only a transient presence in the oral cavity and n the surface of oral câncer. **Microbiology and Immunology**, v. 44, p. 385-8, 2000.

OLIVEIRA, A. G., SANTOS, A., GUERRA, J. B., ROCHA, G. A., ROCHA, A., M., C. OLIVEIRA, C. A., CABRAL, M., M. & QUEIROZ, D. M. *babA2* and *cagA*-Positive *Helicobacter pylori* strains are associated with duodenal ulcer and gastric carcinoma in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3964-66, 2003.

OLIVEIRA-SEVERO, D., WASSERMANN, G. E., CARLINI, C. R. Ureases display biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 851-61, 2006.

OLIVIER, B. J., BOND, R. P., ZYL, W. B., DELPORT, M., SLAVIK, T., ZIADY, C., DROSTE, J. S. T., LASTOVICA, A., MERWES, W. Absence of *Helicobacter pylori* within the oral cavities of members of a healthy South African community. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 635-6, 2006.

ORIOLO, R., DANILO, V. S. J., HAWKINS, B. R. A new genetic model proposing that the *Se* gene is a structural gene closely linked to the *H* gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 33, n. 3, p. 421-31. 1981.

OSHOWO, A., GILLAM, D., BOTHA, A., TURNIO, M., HOLTON, J., BOULOS, P., *et al.* *Helicobacter pylori*: the mouth, stomach and gut axis. **Annals of Periodontology**, v. 3, p. 276-80, 1998.

PARSONETT, J., SHMUELY, H., HAGGERTY, B. S. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. **Journal of the American Medical Association**, v. 282, p. 2240-45, 1999.

PFLUG, W., BÄSSER, G., EBERSPÄCHER, B. ABO and Lewis typing of secretion stains on nitrocellulose membranes using a new Dot-ELISA technique. **Forensic Science International**, v. 43, p.171-82, 1989.

PINELLI, C., LOFFREDO, L. C. M., SERRA, M. C. Reproducibility of a simplified microbiological test for *mutans streptococci*. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 13-18, 2000.

PORTAL-CELHAY, C. & PEREZ-PEREZ, G.I. Immune Responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. **Clinical Science**, v. 110, p. 305-14, 2006.

QUERALT, N. & ARAÚJO, R. Analysis of the survival of *Helicobacter pylori* within a laboratory – based aquatic model system using molecular and classical techniques. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, n. 1, p. 108-11, 2007.

PRATTEN, J., WILSON, M., SPRATT, D. A. Characterization of in vitro oral bacterial biofilm by traditional and molecular methods. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, p. 45-49, 2003.

RAUTEMAA, R., LAUHIO, A., CULLINAN, M. P., SEYMOUR, G. F. Oral infections and systemic disease-an emerging problem in medicine. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, p. 1041-47, 2007.

RICHARD, A. H., MCBAIN, A. J., LEDDER, R. G., HANDLEY, P. S., GILBERT, P. Coaggregation between freshwater bacteria within biofilm and planktonic communities, **FEMS Microbiology Letters**, v. 220, n.1, p. 133-40, 2003.

RIGGIO, M. P. & LENNON, A. Identification by PCR of *Helicobacter pylori* in subgingival plaque of adult periodontitis patients. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, p. 317-22, 1999.

ROSSI-AGUIAR, V. P. R. S., NAVARRO-RODRIGUES, T., MATTAR, R., BARBUTI, R. C., SILVA, F. M., CARRILHO, F. J., EISIG, J. N. oral cavity is not a reservoir for *Helicobacter pylori* in infected patients with functional dyspepsia. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 24, p 1-5. 2009.

ROTHENBACHER, D., WEYERMANN, M., BODE, G., KULAKSIZ, M., STAHAL, B., BRENNER, H. The role of Lewis A and Lewis B blood group antigens in *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v. 9, p. 324-29, 2004.

ROUABHIA, M. Interactions between host and oral commensal microorganisms are key events in health and disease status. **Canadian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 47-51, 2002.

SAITOU, N. & YAMAMOTO, F. Evolution of primate ABO blood group genes and their homologous genes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 4, p. 399-411, 1997.

SAMBROOK, J., FRITSH, E. F., MANIATIS, T. Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. **Molecular Cloning: a laboratory manual**, p. 16-19, 1989.

SGOURAS, D. MARAGKOUidakis, P., PETRAKI, K., MARTINEZ-GONZALEZ, B., ERIOTOU, E., MICHPOULOS, S., KALANTZOPOULOS, G., TSAKALIDOU, E. In Vitro and In Vivo Inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* Strain Shirota. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 518-26, 2004.

SHIVAKUMAR, K. M., VIDYA, S. K., CHANDU, G. N. Dental caries vaccine. **Indian Journal of Dental Research**. Review. v. 20, n. 1, 2009.

SILVA, J. G. **O sorodiagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori* e a associação com o estado nutricional e os grupos sanguíneos ABO e Lewis associado aos antígenos de grupos sanguíneos ABO em uma amostra infantil de Belém-Pa.** Dissertação de mestrado. Belém-Pa, p. 115, 2003.

SILVER, J. G. & KRASSER, B. Treatment of dental caries. **Dental Association**, v. 51, p. 211-15, 1987.

SIMARK-MATTSSON, C., EMILSON, C. G., HAKANSSON, H. E., JACOBSON, C., ROOS, K. & HOLM, S. *Lactobacillus*-mediated interference of *Streptococci mutans* in caries-free vs. Caries-active subjects. **European Journal of Oral Sciences**, v. 115, p. 308-14, 2007.

SMIECH-SLOMKOWSKA, G. & JABLONSKA-ZROBEK, J. The effect of oral health education on dental plaque development and the level of caries-related *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. **European Journal of Orthodontics**, v. 29, p. 157-60, 2007.

SOCHA W.W, BLANCHER A., MOOR-JANKOWSKI J. Red cell polymorphisms in nonhuman primates: a review. **Journal of Medical Primatology**, v.24, n. 4, p. 282-305, 1995.

SOEJIMA, M., MUNKHTULGA, L. YWAMOTO, S. KODA, Y. Genetic variation of *FUT3* in Ghanaians, Caucasians, and Mongolians. **Transfusion**, v. 49, p. 959-66, 2009.

SOEJIMA, M., FUJIHARA, J., TAKESHITA, H., KODA, Y. *Sec1-FUT2-Sec1* hybrid allele generated by interlocus gene conversion. **Transfusion**, v. 48, n. 7, p. 1522-3, 2008.

SOEJIMA, M. & KODA, Y. Distinct single nucleotide polymorphism pattern at the *FUT2* promoter among human populations. **Annals Hematology**, v. 87, p. 19-25, 2008.

SONG, Q., LANGE, T., SPAHR, A., ADLER, G., BODE, G. Characteristic distribution pattern of *H. pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p. 349-53, 2000.

SOUTO, R. & COLOMBO, A. P. V. Detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction in the subgingival biofilm and saliva of non-dyspeptic periodontal patients. *Journal of Periodontology*, v. 79, p. 97-103, 2008.

SPOLIDORIO, D. M. P., SPOLIDORIO, L. C., BARBEIRO, R., HÖFLING, J. F., BERNARDO, W. L. C., PAVAN, S. Avaliação quantitativa de *Streptococcus* do grupo *mutans* e *Candida* sp e fatores salivares na cavidade bucal de pacientes submetidos à radioterapia. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.15, n.4, p. 354-58, 2001.

SREEBNY, L. M., VALDINI, A. Xerostomia: A neglected symptom. **Archives of Internal Medicine**, v. 147, p.1333–37, 1987.

SUERBAUM, S. & JOSENHANS, C. Virulence factors of *Helicobacter pylori*: implications for vaccine development. **Molecular Medicine Today**, v. 5, n. 1, p. 32-39, 1999.

SUZUKI, H., HIBI, T., MARSHALL, B. J. *Helicobacter pylori*: present status and future prospects in Japan. **Journal of Gastroenterology**, v. 42, p. 1-15, 2007.

TEANPAISAN, R. & DAHLEN, G. Use of polymerase chain reaction techniques and sodium dodecyl sulphate-polyacryl-amide gel electrophoresis for differentiation of oral *Lactobacillus* species. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 21, p. 79-83, 2006.

TINDBERG, Y. BENGTISSON, C., GRANATH, F., BLENNOW, M., NYREN, O., GRASTROM. *Helicobacter pylori* infection in Swedish school children: lack of evidence of child-to-child transmission outside the family. **Gastroenterology**, v. 121, n.2, p. 310-16, 2001.

TIWARI, K., KHAN, A. A., AHMED, K. S., KAUSER, F., HUSSAIN, M. A.,ALI, S. M.,HABEEB, A., ADID, Z., Rapid diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients using salivary secretion: a non-invasive approach. **Singapore Medical Journal**, v. 46, n. 5, p. 224-8, 2005.

TORRES, J., PEREZ-PEREZ, G., GOODMAN, K. J., ATHERTON, J. C., GOLD, B. D., HARRIS, P. R., GARZA, A. M., GUARNAR, J., MUÑOS, O. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. **Archive Medical Research**, v. 31, p. 431-69, 2000.

UMEDA, M., KOBAYASHI, H., TAKEUCHI, Y., HAYASHI, J., MOROTOME, Y., YANO, K. High prevalence of *Helicobacter pylori* detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients. **Journal of Periodontology**, v. 4, p. 129-34, 2003.

YAMAMOTO, F.: ABO blood group system - ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-b, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. Review. **Imunohematology**, v. 20, n.1, p. 3- 22, 2004.

YOUNG, K. A., ALLAKER, R. P., HARDIE, J. M. Morphological analysis of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies and dental plaque by scanning electron microscopy. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 16, p. 178-81, 2001.

WILLHITE, D. C., BLANKE, S. R., *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria and induce mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity cell. **Microbiology**, v. 6, p. 143-54, 2004.

ZATERKA, S., EISIG, J. N., CHINZON, D., ROTHSTEIN, W. Factors related to *Helicobacter pylori* prevalence in an adult population in Brazil. **Helicobacter**, v. 12, p. 82-88, 2007.

ZERO, D. T. Dental caries process. **Dental Clinics of North America**, v. 43, p. 635-66, 1999.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 LABORATÓRIO DE IMUNOGENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: Características Epidemiológicas Relativas a doença dental e infecção por *Helicobacter pylori* na cavidade oral de estudantes em Belém-Pará.

A placa dental é composta por bactérias e outros microorganismos, que se ligam nas superfícies dos dentes. Sendo sua função conhecida nas doenças bucais, entre elas, a cárie dental. Esta é uma das doenças humanas de maior incidência na população mundial. A importância de estudá-la se deve ao fato de ser um problema de saúde pública, particularmente devido à seu impacto a nível individual e comunitário, em termo de dor, desconforto e limitações funcionais e sociais, afetando a qualidade de vida. Outra bactéria que pode fazer parte da placa dental é *Helicobacter pylori*. A detecção desta bactéria na placa, ou saliva pode ajudar a esclarecer a sua transmissão, de onde pode ser adquirida de uma pessoa a outra, e assim constituindo-se um fator de risco de doença do estômago. Com a finalidade de desenvolver esta linha de estudo prestamos os seguintes esclarecimentos

1. Será necessário responder algumas perguntas da Ficha-protocolo para fornecer informações sobre a identificação pessoal e de possíveis condições que influenciam no estabelecimento e transmissão da doença.
2. Será realizado neste estudo exames clínicos e laboratorial que possam mostrar a presença da ***Helicobacter pylori*** no dente e na saliva, para realizar o exame laboratorial será necessário a doação de amostras saliva e placa dental.
3. Serão realizados testes moleculares, sorológicos e microbiológicos nestas amostras para a confirmação da infecção.
4. Os exames realizados serão gratuitos, não necessitando nenhum custo por parte do participante para a sua realização.
5. Você receberá orientação completa para o tratamento de sua infecção.
6. Os resultados dos exames serão usados como dados da pesquisa, omitindo-se a identidade do participante. No entanto, os dados serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos e ou para fins de registro junto aos serviços públicos de saúde (Ministério da Saúde).
7. O material biológico coletado será usado exclusivamente para fins deste estudo, sendo que após o término da pesquisa serão desprezadas de acordo com as normas de biossegurança.
8. Em geral este estudo não trará nenhum risco adicional aos indivíduos amostrados por se tratar de estudo não invasivo. Como benefício os participantes terão orientação odontológica no sentido preventivo.
9. Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como poderá se retirar dela no momento que desejar, sem qualquer prejuízo pessoal.

Solicitamos assim, a sua autorização para efetuarmos o referido exame e realizarmos uma entrevista, sendo que a mesma é confidencial; para desenvolvermos a pesquisa sobre a sobre as condições da saúde bucal.

CONSENTIMENTO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo do mesmo, assim como seus benefícios. Declaro ainda que por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, ____ / ____ / ____

 ASSINATURA

Pesquisador responsável: Bióloga Gyselly de Cássia Bastos de Matos; gysamats@hotmail.com
Endereço do Pesquisador Responsável: Avenida Augusto Corrêa s/nº – Campus Universitário do Guamá, CEP 66075-110 Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências da Biológicas, Departamento de Genética.

ANEXO 2

QUESTIONÁRIO

PROJETO: Características Epidemiológicas Relativas à doença dental e infecção por *Helicobacter pylori* na cavidade oral em estudantes de Belém-Pará.

NOME: _____

IDADE: _____ SEXO: _____ TELEFONE: _____

END.: _____

BAIRRO: _____ CEP: _____

DATA: ____/____/____

1. Qual a renda de toda a sua família por mês? () Nenhuma, () 1 a 2 Salários Mínimos, () 2 a 3 Salários Mínimos, () 3 a 5 Salários Mínimos, () 5 a 10 Salários Mínimos, () Mais de 10 Salários Mínimos

2- Atualmente está trabalhando: () Sim () Estudante () Não trabalha () Trabalha e estuda

3- Qual a profissão? _____

4- Qual o seu nível de escolaridade? () Nenhum (não sabe ler nem escrever), () Fundamental incompleto, (...) Fundamental completo, () Médio incompleto, () Médio completo

5- Situação da sua residência:

() Própria () Alugada () Cedida

6- Qual o tipo de material usado na construção de sua residência:

() Taipa () Madeira () Alvenaria

7- Quantos cômodos tem na sua casa?

() Um () Dois () Três

() Quatro () Mais de quatro

8- Quantas pessoas moram na sua residência?

() Uma () Duas () Três

() Quatro () Mais de quatro

9- O banheiro de sua casa é de: (...) Alvenaria () Madeira

10- Tipo de fossa:

() Asséptica () Não asséptica () Fossa negra

11- A rua apresenta rede de esgoto? () Sim () Não

12- A fossa é interligada a rede de esgoto?

() Sim () Não

13- A água que você consome é: () do sistema público de saúde () do poço

14- Qual o tipo de tratamento doméstico da água?

() Coada () Fervida

() Filtrada () Mineral

() Com hipoclorito () Nenhum

15- Com que frequência você escova os dentes?

- () Uma () Duas () Três
() Quatro () Mais de quatro

16- Você utiliza creme dental com flúor nas escovações?

- () Sim () Não
(...) Valor alto () Valor baixo

17- Você utiliza fio dental?

- () Sim () Não

18- Você consome açúcar entre as refeições?

- () Sim () Não

19- Com que frequência você vai ao dentista?

- () Há cada 3 meses
() Há cada 6 meses
() Há cada 1 ano
() Quando sente dor

20- Quando foi sua última visita ao dentista?

- () Até 6 meses
() Até 1 ano
() Mais de 1 ano
() Nunca fui

21. Determinação do fluxo salivar:

Quantidade de saliva por minuto: _____

- (....) Fluxo normal
() Fluxo diminuído

22. Análise da capacidade tampão:

Ph da saliva: _____

- (....) Capacidade tampão normal
() Capacidade tampão diminuída

23. Análise da quantidade de *S. mutans*:

Quantidade de *S. mutans*: _____

24- Índice de CPO-d

<input type="checkbox"/>							
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

<input type="checkbox"/>							
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

<input type="checkbox"/>							
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

<input type="checkbox"/>							
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

CPO-d _____