

Desnutrição neonatal e microbiota normal da cavidade oral em ratos¹

Neonatal malnutrition and normal microbiota of the oral cavity in rats

Solange Maria Magalhães da Silva PORTO²
Marcelo Tavares VIANA²
Karla Melo Ferreira da SILVA³
Maria de Fátima Alves DINIZ⁴
Célia Maria Machado Barbosa de CASTRO⁵

RESUMO

Objetivo

Avaliar a influência da desnutrição neonatal sobre o padrão e o crescimento de bactérias aeróbias, da microbiota normal da cavidade oral, em ratos *Wistar* adultos.

Métodos

O material da cavidade oral foi coletado através de *swabs* embebidos em 40µL de solução salina estéril e colocados em tubos estéreis contendo 960µL de *brain heart infusion*. Posteriormente, fez-se homogeneização de cada uma amostra. Então, destes 1.000µL, retirou-se 1µL e este foi semeado em placas de Petri contendo Agar-sangue e Levine para isolamento e identificação de bactérias Gram+ e Gram-, respectivamente. Essas placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, 48 horas, e as unidades formadoras de colônias que cresceram foram contadas e seus percentuais calculados. Para a bacterioscopia foram confeccionadas lâminas coradas pelo método de Gram.

Resultados

Do 5^o ao 21^o dia de vida os pesos corporais do grupo desnutrido (33,6g:42,8g, desvio-padrão=27,2g) foram menores ($p<0,001$) que os do grupo nutrido (52,5g:56,3g, desvio-padrão=24,0g). Dos 60 aos 120 dias de vida os pesos foram reduzidos no grupo desnutrido (248,2g:290,2g, desvio-padrão=220,2g), quando

¹ Artigo elaborado a partir da dissertação de S.M.M.S. PORTO, intitulada "Desnutrição neonatal e treinamento físico moderado em mecanismos de defesa de ratos adultos". Departamento de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco; 2006.

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição. Recife, PE, Brasil.

³ Estagiária de Iniciação Científica, Graduanda de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Recife, PE, Brasil.

⁴ Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami. Recife, PE, Brasil.

⁵ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Medicina Tropical, Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, Setor de Microbiologia. Campus Universitário, s/n., Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: C.M.M.B. CASTRO. E-mail: <ccastro@lika.ufpe.br>

comparados aos do grupo nutrido (306,2g:319,4g, desvio-padrão=219,5g) teste Mann Whitney, $p < 0,05$. A microbiota foi composta de menor número de bactérias no grupo nutrido ($4,2 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias, desvio-padrão= $1,2 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias de bactérias/mL), comparado ao grupo desnutrido ($7,4 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias, desvio-padrão= $1,0 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias de bactérias/mL) teste "t", ($p = 0,026$). Das bactérias isoladas em culturas, observou-se um padrão bacteriano semelhante nos dois grupos, com 70% de bactérias gram-positivas e 30% de bactérias gram-negativas.

Conclusão

A desnutrição neonatal foi efetiva em reduzir o peso corporal e aumentar o crescimento bacteriano. Embora o padrão bacteriano não tenha sido alterado, o aumento do crescimento bacteriano pode induzir a um desequilíbrio na microbiota oral desfavorecendo assim, o hospedeiro.

Termos de indexação: bactérias aeróbias; boca; desnutrição neonatal; ratos Wistar.

ABSTRACT

Objective

To evaluate the influence of neonatal malnutrition on the pattern and growth of aerobic bacteria of the normal bacterial flora of the oral cavity in adults Wistar rats.

Methods

In the present study, the material of the oral cavity was collected through swabs soaked in 40µL of sterile saline solution. After the collection, each swab was placed in a sterile tube containing 960µL of brain heart infusion. Later, the samples were homogenized. Then, from the 1.000µL, 1µL was collected with a gauged loop to be sowed in Petri dishes containing Agar-blood and Agar-Levine, for the isolation and identification of the Gram-positive and Gram-negative bacteria respectively. The plates were placed into a bacteriological incubator, 37°C, for 48 hours and the colony-forming units that grew were counted and their percentages were calculated. For bacterioscopy, slides were stained with the Gram method.

Results

From the 5th to the 21st day of life, body weight of the undernourished group (33.6g:42.8g, standard deviation=27.2g) was smaller ($p < 0.001$) than that of the nourished group (52.5g:56.3g, standard deviation=24.0g). From the 60th to the 120th days of life the body weight of the undernourished group (7.4×10^6 colony-forming units, standard deviation= $1,0 \times 10^6$ colony-forming units bacteria/mL) decreased when compared to that of the nourished group (306.2g:319.4g, standard deviation=219.5g), Mann-Whitney test, $p < 0,05$. The microbiota was composed of a smaller number of bacteria in the nourished group (4.2×10^6 colony-forming units, standard deviation= 1.2×10^6 colony-forming units bacteria/mL) when compared with the undernourished group (7.4×10^6 colony-forming units, standard deviation= 1.0×10^6 colony-forming units bacteria/mL), Student's "t" test ($p = 0.026$). From the bacteria isolated in cultures, a similar bacterial pattern was observed in both groups, with 70% of Gram-positive bacteria and 30% of Gram-negative bacteria.

Conclusion

Neonatal malnutrition was effective in decreasing body weight and increasing bacterial growth. Although the bacterial pattern was not altered, the increase in bacterial growth may induce an imbalance of the oral microbiota, being a threat to the host.

Indexing terms: bacteria, aerobic; mouth; neonatal malnutrition; rats Wistar.

INTRODUÇÃO

A enorme variedade de organismos que causam doenças infecciosas pode ser agrupada em seis categorias principais: vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos e artrópodes. Cada

uma das categorias apresenta características distintas, que determinam maneiras de interação com os hospedeiros e, portanto, contribuem para as características das doenças que os organismos causam. Entre estas propriedades estão a constituição estrutural e molecular, as estratégias

metabólicas e os processos reprodutivos. Algumas espécies, entretanto, são positivamente benéficas à saúde do hospedeiro. A microbiota normal, da qual fazem parte os organismos que vivem no nosso corpo sem causar doença, é imprescindível para a proteção contra o estabelecimento de micróbios patogênicos¹.

A microbiota endógena inclui todos os microorganismos (bactérias, fungos, protozoários e vírus) que residem no interior ou na superfície corporal dos seres sadios². Quando o número habitual de microorganismos residentes está muito reduzido, os invasores oportunistas podem, então, se estabelecer mais facilmente³.

A cavidade oral, por exemplo, apresenta uma das mais concentradas e variadas populações microbianas, cuja localização principal está no dorso da língua, no sulco gengival e na placa dental coronariana⁴. Estima-se que a saliva contém 10^8 bactérias/mL e as placas dentais, 10^{11} bactérias/mL. Participam desta flora numerosos gêneros, como: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Bacteróides*, *Actinomyces*, *Treponema*, *Mycoplasma* e outros⁵⁻⁷. Isogai et al.⁸ isolaram mais de 15 bactérias na cavidade oral de ratos, dentre estas os tipos predominantemente isolados na saliva, no dorso da língua, na mucosa bucal e no sulco gengival foram: *Streptococcus ssp.*, *Lactobacillus ssp.*, *Veillonella ssp.* e *Neisseria ssp.*

Não existem estudos, até o presente momento, relacionando a desnutrição neonatal com a microbiota oral. Nessa situação é possível haver modificações dos microorganismos, tanto em quantidade como em qualidade na cavidade oral, já que a desnutrição contribui para menor resistência, ou seja, maior vulnerabilidade às doenças e às altas taxas de infecções com elevado risco de mortalidade⁵.

Assim, este estudo pretende avaliar o impacto da desnutrição no período de aleitamento sobre a microbiota da cavidade oral, após recuperação nutricional em ratos adultos. O estudo desses aspectos em animais tem importância do ponto de vista experimental e clínico, devido à diversidade de reações do organismo, particu-

larmente, às eventuais seqüelas sobre os mecanismos de defesa orgânicos, ocasionadas por agressões nutricionais sofridas no período neonatal, por ser um período de grande vulnerabilidade em decorrência da formação dos diversos sistemas orgânicos.

MÉTODOS

Foram utilizados 36 ratos machos, albinos, da linhagem *Wistar*, provenientes do biotério do Departamento de Nutrição, da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos a uma temperatura de 23°C, com variação de 1°C, em ciclo claro/escuro invertido de 12h (claro-21 a 9h; escuro-9 às 21h), com acesso livre à água e à ração.

Os animais foram obtidos acasalando-se machos e fêmeas adultos, na proporção de um macho para três fêmeas, por um período de 16 dias⁹. O diagnóstico da prenhez foi feito pela observação do crescimento do ventre. Um dia após o nascimento, a ninhada foi padronizada em seis filhotes machos por mãe. Esse número parece conferir maior potencial lactotrófico⁹. Nesse mesmo dia, adotado como primeiro dia de vida do animal, as ninhadas foram divididas nos grupos: nutrido (N) - constituído por 18 filhotes amamentados por mães submetidas à dieta contendo 17% de proteína (caseína), e desnutrido (D) - constituído por 18 filhotes amamentados por mães submetidas à dieta contendo 8% de proteína (caseína).

Os animais dos dois grupos foram amamentados durante os primeiros 21 dias após o nascimento⁹. Nesse período foram registrados diariamente (em balança eletrônica digital - Marte, modelo S-4000-com sensibilidade de 0,1g) os pesos corporais (PC) de cada animal. A partir do 22º dia de vida até o final do experimento, o peso corporal era aferido uma vez por semana, objetivando acompanhar a recuperação nutricional dos animais. Após o desmame, no 22º dia de vida, os animais foram separados de suas mães e mantidos

em gaiolas coletivas contendo 3 ratos em cada gaiola, com dieta Labina, adotada como padrão no Biotério, contendo 23% de proteínas mistas, até o final do experimento.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, e seguiu as normas sugeridas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Microbiota oral

Realizou-se coleta da cavidade oral de todos os animais dos grupos N e D, aos 60-120 dias de vida. Cada animal foi segurado na posição vertical de modo que suas patas fossem imobilizadas. Em seguida, a flora bacteriana oral foi coletada através de swabs embebidos em 40µL de solução salina de NaCl 0,9%, estéril.

Após coleta do swab, este foi colocado em tubo estéril contendo 960µL de *Brain Heart Infusion* (BHI), meio líquido enriquecido que permite o crescimento bacteriano. Posteriormente, fazia-se a homogeneização das amostras e lâminas foram confeccionadas para a realização da coloração de Gram. Além disso, destes 1.000µL retirava-se, com o auxílio de alça calibrada, 1µL, que foi semeado em placas de Petri contendo Agar-sangue e Agar-Levine, para isolamento das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. Essas placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, por 48 horas, e as unidades formadoras de colônias (UFC) que cresceram foram quantificadas e seus percentuais calculados. A identificação da espécie foi realizada em sistema automatizado MicroScan®.

RESULTADOS

Nos primeiros dias de vida, os pesos (g) corporais dos grupos N e D, expressos em mediana, valores máximos e mínimos, foram seme-

lhantes. A partir do 5º dia até o 21º dia pós-natal, os valores dos pesos corporais do grupo D (33,6g:42,8g, desvio-padrão - DP=27,2g) foram menores ($p<0,001$) do que os do grupo N (52,5g:56,3g, DP=24,0g) (Figura 1).

Aos 60-120 dias de vida os pesos corporais dos animais dos grupos N e D foram expressos por mediana mediana, valores máximos, mínimos e comparados. Houve redução dos pesos no grupo D (248,2g:290,2g, DP=220,2g) em comparação ao grupo N (306,2g:319,4g, DP=219,5g), segundo o teste Mann Whitney, $p<0,05$ (Figura 2).

Após análise do material coletado nos dois grupos de ratos, observou-se que a microbiota oral foi composta por um menor número de bactérias, no grupo N ($4,2\text{UFC}\times 10^6$, DP= $1\text{UFC}\times 10^6$) comparativamente ao grupo D ($7,4\text{UFC}\times 10^6$, DP= $1,2\text{UFC}\times 10^6$), teste *t*, ($p=0,026$) (Figura 3).

A ordem das freqüências das bactérias aeróbias encontradas foi a seguinte: *Bacillus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus coagulase negativo*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Citrobacter*, *Escherichia coli* e

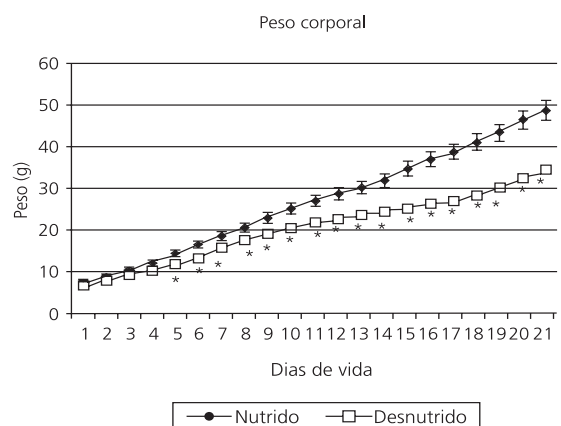


Figura 1. Acompanhamento do peso corporal durante a desnutrição neonatal (21 dias) dos grupos Nutrido e Desnutrido, em ratos *Wistar* adultos. Recife, PE, 2006.

Valores expressos gramas de peso corporal, mediana, valores máximos e mínimos. Teste Mann Whitney (* diferença de peso a partir do 5º dia de vida $p<0,001$).

Pseudomonas. Destas 70% foram de bactérias gram-positivas e 30% de bactérias gram-negativas.

O padrão de bactéria encontrado foi o mesmo nos dois grupos.

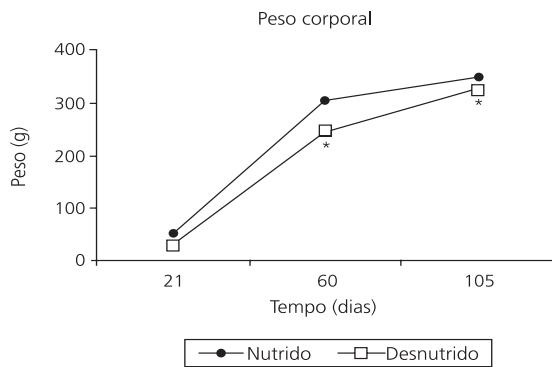


Figura 2. Acompanhamento do peso corporal durante a recuperação nutricional dos grupos Nutrido e Desnutrido, em ratos *Wistar* adultos. Recife, PE, 2006.

Valores expressos em gramas de peso corporal, mediana, valores máximos e mínimos. Teste Mann Whitney (* diferença do peso aos 60 e aos 105 dias de vida $p < 0,005$).

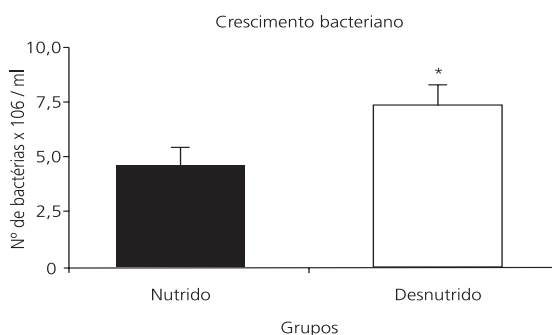


Figura 3. Crescimento bacteriano segundo o estado nutricional nos grupos Nutrido e Desnutrido, em ratos *Wistar* adultos. Recife, PE, 2006.

Valores expressos em média e desvio padrão. Teste "t" de Student (* aumento do crescimento bacteriano em UFC/mL $p < 0,005$).

DISCUSSÃO

No presente estudo, utilizou-se modelo de desnutrição imposta no período de aleitamento, seguida de recuperação nutricional, com as

avaliações sendo realizadas na vida adulta do animal. Assim, neste estudo, a desnutrição ocorrida precocemente causou déficit no peso corporal, levando ao retardo da evolução ponderal no período de aleitamento. Estes dados corroboram aqueles obtidos por Medeiros et al.¹⁰, Porto et al.¹¹ e Barros et al.¹², que empregaram a dieta básica regional (DBR), deficiente em todos os seus constituintes¹³, como modelo experimental de desnutrição. Apesar dos diferentes modelos experimentais de desnutrição usados, neste estudo, a deficiência de proteínas (caseína) utilizada foi suficiente para causar desnutrição. A dieta de caseína a 8% é caracterizada como hipoprotéica, e provoca alteração no teor protéico do leite de lactantes que a ingerem. Esse parece ser um fator determinante na gênese de seus efeitos deletérios observados na prole.

A desnutrição ocorrida nesse período também afetou o peso corporal dos animais na idade adulta. Oferta da dieta equilibrada (Labina) a partir do desmame, parece não ter sido eficiente para recuperar a deficiência de peso originada ainda na amamentação. Esses resultados estão em concordância com aqueles de Barros et al.¹², que também encontraram redução do peso corporal verificada, inclusive, até a idade adulta.

Portanto, o uso de dieta hipoprotéica à base de proteína animal (caseína), na concentração de 8%, por lactantes durante o período de aleitamento, modificou o teor protéico do leite materno e levou ao déficit ponderal dos filhotes, tanto no período de lactação quanto na idade adulta após recuperação.

Os estudos relacionados à desnutrição precoce são escassos, sobretudo aqueles que avaliam os efeitos da restrição protéica no período de lactação¹⁴. Alguns autores relatam alteração na concentração protéica do leite por restrição do suprimento de aminoácidos necessários para a síntese de proteína do leite¹⁵. Neste estudo, o período no qual a agressão nutricional foi conduzida é caracterizado por um intenso processo de

crescimento e desenvolvimento orgânicos, o que demanda aumento das necessidades de energia e proteínas¹⁵. Os efeitos da restrição protéica durante o período de aleitamento foram demonstrados em ratos desde o quarto dia de vida pós-natal¹⁶. De modo similar, os resultados obtidos neste trabalho também demonstraram redução do ganho de peso durante o aleitamento a partir do quinto dia de vida pós-natal, quando as mães receberam dieta experimental hipoprotéica.

É conhecido de longa data que a desnutrição prejudica as defesas orgânicas. Porém, não existem estudos conduzidos com desnutrição ocorrida no período de aleitamento, seguida de recuperação nutricional, e na vida adulta do animal, sobre a microbiota oral. Essa microbiota sofre alterações significativas decorrentes de modificações sofridas nos fatores externos, ou daqueles relacionados ao hospedeiro e ou às bactérias^{2,4,5,17-20}. Neste estudo, a análise da microbiota oral obtida da cavidade oral dos animais, revelou que o grupo Desnutrido apresentou uma microbiota com um maior número de bactérias, quando comparada ao grupo Nutrido. Esse aumento pode ter sido conseqüente à manipulação nutricional sofrida no período de aleitamento.

A desnutrição precoce sofrida no grupo de animais pesquisados pode ter sido um dos fatores que levou a essa alteração. A maioria desses microorganismos, que compõem a microbiota, pode ser encontrada na cavidade oral de indivíduos saudáveis. Portanto, em conseqüência às alterações de determinados fatores, como a nutrição, pode ocorrer um desequilíbrio entre a microbiota e o hospedeiro. Tal fato predispõe a instalação de processos inflamatórios e/ou infecciosos^{6,21-24}. Apesar de neste trabalho ter havido manutenção qualitativa do padrão de normalidade da microbiota, foi observada uma maior quantidade de bactérias nos animais desnutridos precocemente, e isto pode proporcionar um desequilíbrio entre as bactérias da microbiota e o hospedeiro. Totti et al.¹⁷, Darby-Curtis¹⁹, Yao et al.²⁵ e Beckers & van der Hoeven²⁶ afirmaram que são vários os

fatores que contribuem para mudanças na composição da microbiota como: determinadas características genéticas e raciais, idade, maturidade do sistema imune, dieta, puberdade, erupção dos dentes decíduos e permanentes, higiene oral, cárie, enfermidade periodontal ou infecção, diminuição do fluxo salivar e uso de medicações.

Neste estudo, pela ordem das frequências, as bactérias aeróbias encontradas foram: *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus coagulase negativo*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Citrobacter*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas*. Destas, 70% foram de bactérias gram-positivas e 30% de bactérias gram-negativas. Tais percentuais indicam que a prevalência encontrada para as bactérias foi a mesma encontrada na microbiota normal para os dois grupos. Esses dados são concordantes com outros estudos^{18,27,28} que se referem a até 80% de bactérias gram-positivas na microbiota normal da cavidade oral. Quanto ao número de eventos, as bactérias mais freqüentes foram: *Bacillus* sp. e *Streptococcus viridans*, que apresentaram 57 eventos, e a menos freqüente foi a *Enterococcus*, com 4 eventos. Estes dados são semelhantes aos observados em outros trabalhos^{2,6,20,23,24}. De acordo com Burton & Engelkirk³, a microbiota da cavidade oral é muito diversificada e se estima que a saliva contém em torno de 10⁸ bactérias/mL. Neste estudo, os resultados encontrados sobre o crescimento bacteriano foram menores, na ordem de 10⁶ bactérias/mL e esse achado, provavelmente, pode ser explicado pelo fato de não terem sido incluídas na pesquisa as bactérias anaeróbias.

Conclui-se que, nas condições deste trabalho, a desnutrição no período de lactação, seguida de recuperação nutricional, acarreta redução do peso corporal a partir do 5º dia de vida pós-natal, mantendo-se até a vida adulta. Ocorre, também, uma alteração da microbiota oral consistindo em aumento na quantidade de bactérias, porém, não houve interferência na qualidade das

bactérias, já que prevaleceram o mesmo padrão e os mesmos eventos referentes às bactérias aeróbias, presentes nos animais com nutrição adequada. O aumento da quantidade de bactérias da microbiota oral, mesmo mantendo o mesmo padrão bacteriano, pode desencadear um desequilíbrio acarretando prejuízo na resposta de defesa do hospedeiro.

COLABORADORES

S.M.M.S. PORTO participou da elaboração do projeto de pesquisa, da estratégia experimental, da coleta de dados, da tabulação e da discussão dos resultados e da elaboração do artigo. M.T. VIANA participou da tabulação dos dados e estudo estatístico. K.M.F. SILVA participou da preparação dos grupos experimentais, manutenção dos animais no biotério e da coleta das amostras. M.F.A. DINIZ participou da preparação das amostras e coleta dos dados. C.M.M.B. CASTRO participou da elaboração do projeto de pesquisa, tabulação e discussão dos resultados e elaboração do artigo.

REFERÊNCIAS

- Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 2001; 183(1): 3770-83.
- Burton GRW, Engelkirk PG. Microbiologia: para as ciências da saúde. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
- Lindhe, J. Microbiologia da doença periodontal associada à placa. In: Tratado de periodontologia clínica. 2a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1992.
- Gutierrez-Perez JL, Perea-Perez EJ, Romero-Ruiz MM, Giron-Gonzales JA. Orofacial infections of odontogenic origin. *Méd Oral.* 2004; 9(1):280-7.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Princípios de doença e epidemiologia. In: Microbiologia. 6a. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul; 2000. p.394-420.
- Trabulsi LR. Flora normal do corpo humano. In: Microbiologia. Rio de Janeiro: Atheneu; 1986. p.35-7.
- Isogai E, Isogai H, Sawada H, Kaneko H, Ito N. Microbial ecology of plaque in rats with naturally occurring gingivitis. *Infect Immun.* 1985; 489(1): 520-7.
- Committee on Laboratory Animal Diets. Assembly of life sciences. National Research Council. Control of diet in laboratory animal experimentation. *Nutr Abstr Rev.* 1979; 40(1):413-9.
- Medeiros JMB, Feitoza EG, Magalhães. Lima K, Cabral Filho JE, Castro FMM, et al. Malnutrition during brain growth spurt alters the effect of fluoxetine on aggressive behavior in adult rats. *Nutr Neurosci (USA).* 2004; 7(1):49-52.
- Porto S, Araujo FRG, Melo JF, Silva RR, Silva KMF, Castro CMMB. Cinética do perfil leucocitário do sangue, antes e após treinamento físico moderado, em ratos adultos desnutridos no período neonatal. *Anais Fac Med Univ Fed Pernambuco.* 2006; 51(2):59-65.
- Barros KMFT, Manhães de Castro R, Sousa SL, Matos RJB, Deiró TCBJ, Cabral Filho JE, et al. A regional model (Northeast Brazil) of induced malnutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutr Neurosci (UK).* 2006; 9(0):99-104.
- Teodósio NR, Lago ES, Romani SAM, Guedes RCA. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Plant Foods Hum Nutr.* 1990; 40(4):289-96.
- Pyne DB, Gleeson M. Effects of intensive training on immunity in athletes. *Int J Sports Med.* 1998; 19(1):138-94.
- Brown JL, Pollitt E. Malnutrition, poverty and intellectual development. *Sci Am.* 1996; 2(1): 38-43.
- Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr.* 1997; 66(2): 460S-3S.
- Totti MAG, Jorge AOC, Rego MA, Almeida DP. Recuperação de *Candida Albicans*, *C. Tropicalis*, *C. Guilliermondii* e *C. Krusei* na cavidade bucal de ratos normais e sialoadenectomizados. *Rev Odontol UNESP.* 1996; 25(1):119-24,
- Koller MM, Maeda N, Nowzari H, Jorgensen MG. Desipramine changes salivary gland function, oral microbiota, and oral health in rats. *Eur J Pharmacol.* 2000; 408(1):91-8.
- Darby I, Curtis M. Microbiology of periodontal disease in children and young adults. *Periodontology 2000.* 2001; 26(1):33-53.
- Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000.* 2005; 38(1): 135-87.

21. Marotta F, Barreto R, Kawakita S, Minelli E, Pavasuthipaisit K, Lorenzetti A, et al. Preventive strategy for *Candida* gut translocation during ischemia-reperfusion injury supervening on protein-calorie malnutrition. *Chin J Dig Dis.* 2006; 7(1):33-8.
22. Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62(1):71-109.
23. Maitland K, Berkley JA, Shebbe M, Peshu N, English M, Newton CR. Children with severe malnutrition: can those at highest risk of death be identified with the WHO protocol? *PLoS Med.* 2006; 3(12):e500.
24. Ye P, Shearer CK, Yates MG. *Streptococci* and *Actinomyces* induce antibodies which cross react with epithelial antigens in periodontitis. *Clin Exp Immunol.* 2003; 131(1):468-76.
25. Yao ES, Lamont RJ, Leu SP. Interbacterial binding among strains of pathogenic and commensal oral bacterial species. *Oral Microbiol Immunol.* 1996; 11(1):35-41.
26. Beckers HJ, van der Hoeven JS. The effects of mutual interaction and host diet on the growth rates of the bacteria *Actinomyces viscosus* and *Streptococcus mutans* during colonization of tooth surfaces in di-associated gnotobiotic rats. *Arch Oral Biol.* 1984; 29(3):231-6.
27. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 1980; 44(2):331-84.
28. Trudel L, St-Amand L, Bareil M, Cardinal P, Lavoie MC. Bacteriology of the oral cavity of the BALB/c mice. *Can J Microbiol.* 1986; 32(1):673-8.

Recebido em: 2/8/2006
 Versão final reapresentada em: 9/8/2007
 Aprovado em: 14/9/2007