

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



“Uma investigação paleoepidemiológica sobre a cárie dentária em perspectiva epidemiológica e microbiológica”

por

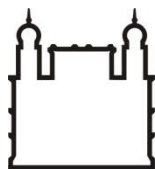
Thaíla Santos Pessanha

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de Epidemiologia em Saúde Pública.

Orientadora principal: Prof.^a Dr.^a Sheila Maria Ferraz Mendonça de Souza

Segunda orientadora: Prof.^a Dr.^a Joseli Maria da Rocha Nogueira

Rio de Janeiro, maio de 2015.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Esta dissertação, intitulada

***“Uma investigação paleoepidemiológica sobre a cárie dentária em
perspectiva epidemiológica e microbiológica”***

apresentada por

Thaíla Santos Pessanha

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Andersen Liryo da Silva

Prof. Dr. Paulo Nadanovsky

Prof.^a Dr.^a Sheila Maria Ferraz Mendonça de Souza – Orientadora principal

Dissertação defendida e aprovada em 13 de maio de 2015.

Catálogo na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

P475u Pessanha, Thaíla Santos
 Uma investigação paleoepidemiológica sobre a cárie
dentária em perspectiva epidemiológica e microbiológica. /
Thaíla Santos Pessanha. -- 2015.
 110 f. : il. ; tab. ; graf.

 Orientador: Sheila Maria Ferraz Mendonça de Souza
 Joseli Maria da Rocha Nogueira
 Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde
Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2015.

 1. Cárie Dentária. 2. Paleopatologia. 3. Parasitologia.
4. Epidemiologia. 5. Cálculos Dentários. 6. Fósseis.
7. Microbiologia. I. Título.

CDD – 22.ed. – 617.67

À minha família, por sempre me fazer seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Sheila Mendonça de Souza, primeiramente pela oportunidade de realização deste trabalho, por sempre estimular a conhecer, procura e ir à busca do conhecimento científico e por fim, pelo apoio em horas especiais. Muito obrigada pela oportunidade.

À Dra. Joseli Nogueira, por aceitar ser co-orientadora deste trabalho. Obrigada pelas horas em seu laboratório me ensinando a identificar bactérias, sempre com muita risada e bom humor.

À Dra. Cláudia Rodrigues Carvalho, pela ajuda ao acesso ao material do sambaqui de Cabeçuda, se disponibilizando a ajudar sempre que foi necessário e por aceitar ser membro da banca de qualificação e banca de defesa, agregando seu conhecimento a este trabalho.

Ao Dr. Andersen Liryo, pelo acesso ao material de Cabeçuda, pela ajuda na identificação dos dentes deste trabalho e por sempre se disponibilizar a ajudar quando é necessário, passando à diante, seu conhecimento.

Ao Dr. Sérgio Chaves, por disponibilizar seu laboratório para os procedimentos deste trabalho.

Ao Dr. Paulo Nadanovyski, pelo conhecimento maior sobre Epidemiologia na disciplina em sala de aula e por aceitar ser membro da banca de defesa agregando conhecimento epidemiológico a este trabalho.

Ao Dr. Adauto Araújo (*in memorian*), por todas as oportunidades que me foram dadas e por sempre estar presente.

À toda equipe do Laboratório de Paleoparasitologia, além de companheiros de pesquisas, discussão de artigos e ajuda em trabalhos, vocês são meus amigos e me sinto muito sortuda de estar entre vocês.

Aos amigos de turma, que fizeram todas as disciplinas, mesmo em dias mais chatos, se tornarem mais legais. Com vocês, dividi um ano dessa jornada. Obrigada a todos.

À minha família, que estão sempre presentes, em todos os momentos. Para estes, nem toda palavra do mundo caberia neste agradecimento.

Às minhas cachorrinhas, simplesmente por existirem. Em especial, Pupy, minha “filha”.

RESUMO

A paleoepidemiologia utiliza como fonte de estudo, remanescentes de corpos humanos provenientes de série esquelética. Destas séries, são utilizados como instrumento de estudo a análise de aparatos dentários/dentes para melhor compreensão da saúde oral de povos pré-históricos, principalmente no que se refere à exposição ambiente biológico, patógenos, práticas alimentares e padrões nutricionais. Estes fatores contribuem para melhor compreensão de aspectos culturais e ambientais para obter resultados consistentes sobre modo de vida e saúde das populações no passado.

Neste trabalho foram utilizados 19 dentes provenientes da série esquelética do Sambaqui de Cabeçuda, sítio arqueológico qual o povo que ali habitava possui uma característica singular, em comparação aos demais sítios estudados no que se refere a saúde oral: dentes com ausência do processo cariogênico. É sabido que povos sambaqueiros possuem uma alta exposição ao ambiente marinho, o qual, bactérias de *Vibrio* são universalmente presentes. Estes cenários, motivaram a presente pesquisa, o qual problematizou tal ausência do processo cariogênico e levantou a hipótese da possível presença de bactérias do tipo *Vibrio* de água salina na cavidade oral dos povos de sambaqueiros, especialmente aqueles cujo estilo de vida fosse mais intimamente relacionada à questão do uso e exposição ao ambiente aquático litorâneo, expresso no uso e consumo de materiais oriundos das lagunas e do mar. O presente trabalho, objetivou de forma geral, investigar a presença de vibriões, pela documentação e interpretação da morfologia dos microfósseis bacterianos encontrados nos cálculos dentários provenientes de esqueletos humanos do sambaqui de Cabeçuda.

A análise dos microfósseis bacterianos, propôs uma primeira interpretação sobre a constituição dos biofilmes que originaram os cálculos dentários e sua possível relação com a ausência de cáries dentárias naquele grupo pré-histórico.

Palavras-chave: paleoepidemiologia, cárie dentária, cálculos dentários, microfósseis bacterianos

ABSTRACT

The paleoepidemiology uses as a source of study, remains of human bodies from skeletal series. Of these series are used as tool to study the analysis of dental apparatuses / teeth for a better understanding of prehistoric oral health, especially with regard to exposure biological environment, pathogens, food and nutritional practices standards. These factors contribute to better understanding of cultural and environmental aspects for consistent results on lifestyle and health of populations in the past.

In this study was used 19 teeth from skeletal series of Sambaqui de Cabeçuda, archaeological site that has a unique feature compared to the other sites studied in relation to oral health: teeth with lack of cariogenic process. It is known that *sambaqueiros* groups have a high exposure to the marine environment, which, *Vibrio* bacteria are universally present. This scenarios have motivated this research, which problematized such absence of cariogenic process and hypothesized the possible presence of bacteria *Vibrio*, type of saline water in the oral cavity of the *sambaquis* groups, especially those whose lifestyle was more closely related to question of the use and exposure to coastal aquatic environment, expressed in the use and consumption of materials from the lagoons and the sea. This study aimed in general, investigate the presence of *Vibrio*, the documentation and interpretation of the morphology of bacterial microfossils found in dental calculus from human skeletons sambaqui of Cabeçuda.

The analysis of bacterial microfossils, proposed an initial interpretation of the constitution of biofilms that originated dental calculus and the possible relation with absence of dental caries in that prehistoric group.

Keywords: paleoepidemiology, dental carie, dental calculus, bacterial microfossils

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: vista do sambaqui de Cabeçuda com setas indicando o local de escavação realizada em 1950/1951 (CASTRO FARIA, 1955).....	53
Figura 2 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1673, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.	67
Figura 3 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1674, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.	68
Figura 4 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1675, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.	69
Figura 5 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1691, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.	70
Figura 6 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1701, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.....	71
Figura 7 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1729, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.	72
Figura 8 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1738, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.	73
Figura 9 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1743, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.	74
Figura 10 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1744, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.	75
Figura 11 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1753, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.	76
Figura 12 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1771, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.	77

Figura 13 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1778, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.	78
Figura 14 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1793, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.	79
Figura 15 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1796, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.	80
Figura 16 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1916, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.	81
Figura 17 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1918, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.	82
Figura 18 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1920, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.....	83
Figura 19 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1924, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.....	84
Figura 20 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1942, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.....	85

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Os dentes humanos e sua anatomia: tecidos duros.....	15
2.2. Microbiota bacteriana e ecologia da cavidade oral.....	19
2.3. Cálculos dentários: relações com a formação da placa e a dieta...	27
2.4. Cárie dentária.....	31
2.5. Estudos sobre saúde dentária em populações antigas.....	38
2.6. Povos construtores de sambaqui: sítios arqueológicos, cultura e ambiente.....	44
3. OBJETIVOS.....	49
3.1. Objetivo Geral.....	49
3.2. Objetivos específicos.....	49
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
5. RESULTADOS.....	60
6. DISCUSSÃO.....	86
7. CONCLUSÃO.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
APÊNDICE.....	108

I. INTRODUÇÃO

Paleopatologia é o estudo das doenças, distúrbios fisiológicos e deficiências que acometeram organismos vivos, podendo ajudar a reconstituir a vida humana no passado. Esta disciplina comprovou que as doenças podem ser estudadas em humanos e animais desde a mais remota antiguidade. As informações sobre as doenças são elementos importantes para ajudar a pensar sobre o estilo de vida e história dos grupos humanos do passado. As informações contidas na biologia esquelética fornecem um conjunto único de evidências que auxiliam no diagnóstico de doenças infecciosas e não infecciosas no passado, podendo haver uma melhor interpretação do modo como a espécie humana se adaptou as mudanças que ocorriam no meio ambiente e como as variações da cultura e das sociedades ao longo do tempo e do espaço afetaram a saúde humana (ZUCKERMAN et al., 2012; BOLDSSEN; MILNER, 2012; ORTNER, 2011; MENDONÇA DE SOUZA et al., 2003).

A análise das informações paleopatológicas em contexto populacional é de interesse da paleoepidemiologia, que observa os sinais patológicos em análises de remanescentes de corpos humanos provenientes de séries arqueológicas, a fim de reconstruir a distribuição de espacial, temporal e social da saúde e doença em grupos do passado. Isto é feito com base em modelos bioculturais e objetiva a distribuição de determinantes de estados relacionados com a saúde, em grupos específicos no passado (BOLDSSEN; MILNER, 2012; MENDONÇA DE SOUZA et al., 2003; LARSEN, 1997).

Os dados de saúde oral referentes à exposição ao ambiente biológico, patógenos, práticas alimentares e padrões nutricionais também contribuem para a melhor compreensão de aspectos culturais e ambientais. A reconstrução do modo de vida em

relação à saúde oral vem sendo estudada em diferentes aspectos, sejam eles relacionados à dieta alimentar de grupos arqueológicos, através da análise de indicadores, enfocando processos dento-patológicos, ou condições de processos infecciosos dentários ou periodontais, como por exemplo, a cárie dentária (LUKACS, 1989; WESOŁOWSKI et al, 2007; MENDONÇA DE SOUZA, 1995).

A cárie dentária é uma doença infecciosa multicausal, que resulta da interação de três variáveis principais: bactérias, açúcares e susceptibilidade do hospedeiro. Micro-organismos tais como *Streptococcus salivaris*, *Streptococcus mutans* e lactobacilos, estão presentes na microbiota oral com outras espécies não cariogênicas. Alguns autores postulam que a microbiota potencialmente cariogênica é composta de um número de bactérias acidogênicas e acidófilas que, em combinação diferente, pode causar cáries quando as condições ambientais forem apropriadas para tal processo. Além de causar doenças orais, tais como gengivite e periodontite, podem também causar doenças sistêmicas como problemas cardiovasculares (KLEINBERG, 2002; SOCRANSKY; MANGANIELLO, 1971) tornando-se um importante problema de saúde pública.

No Brasil, a maioria dos estudos paleoepidemiológicos de cárie foram realizados em amostras de sítios arqueológicos conhecidos como “sambaqui”, que são sítios pré-históricos, construídos intencionalmente por grupos de pescadores-coletores-caçadores que viveram ao longo da costa brasileira. Os sítios arqueológicos deixados por tais povos são encontrados com maior frequência no Sul e Sudeste do Brasil. Estes estão localizados geralmente em manguezais, perto de estuários costeiros, lagoas, lagunas e baías. O estilo de vida dos grupos que construíam os sambaquis os deixava expostos em contato com uma ecologia peculiar, a ecologia dos ambientes costeiros onde é forte a influência da água salina. Eram populações especializadas na exploração econômica de

ambientes costeiros (GASPAR, 1994; GASPAR, 2004; GIANNINI et. al., 2010), onde mesmo os povos da atualidade, apresentam superfícies corporais colonizadas por micro-organismos típicos destes ambientes e sofrem as consequências da exposição aos mesmos. Infecções cutâneas, diarreias, periostite, ente outros problemas, decorrem desta condição, e estão descritos para a França, Japão e outros países (MENDONÇA DE SOUZA, 1995).

Apesar de haver muitos estudos sobre saúde dos dentes e da boca em sítios pré-históricos, as linhas de investigação paleoepidemiológicas da cárie geralmente buscam evidências do uso de dietas mais ou menos favoráveis. As dietas mais favoráveis são associadas geralmente com a domesticação e o aumento de ingestão de carboidratos. Entretanto são poucos os estudos que buscam verificar a presença dos agentes causadores da infecção crônicas, como forma de explicar as diferentes frequências de cáries no passado. As novas técnicas desenvolvidas nos últimos anos começam a permitir uma abordagem etiológica mais específica. Uma delas é o estudo baseado na biologia molecular (ADLER et al., 2013), e outro é a análise de microfósseis contidos nos cálculos dentários, onde as bactérias podem ser diretamente visualizadas.

O presente estudo buscou um melhor entendimento da saúde oral em um contexto biocultural destas populações, visualizando por meio de microscopia eletrônica de varredura os microfósseis bacterianos existentes nos cálculos dentários, fonte de informação sobre a microbiota bacteriana oral destes grupos e seu potencial cariogênico, a partir da hipótese de Mendonça de Souza (1995) sobre uma possível ecologia diferenciada e não favorável a cárie.

Para tanto foram desenvolvidos alguns procedimentos para evidenciar os microfósseis bacterianos e propor sua caracterização inicial para explicar a ausência de

cárie no sambaqui de Cabeçuda, situado em Laguna, Santa Catarina, Brasil, cuja coleção de esqueletos humanos chama atenção pela ausência da doença cárie em milhares de dentes e centenas de indivíduos estudados.

A presente pesquisa problematizou a ausência de cárie neste grupo do sambaqui de Cabeçuda e questiona se há na flora oral destes grupos bactérias não cariogênicas em proporção que justifique uma ecologia da boca diferenciada e não favorável a cárie?

Para tal questionamento, foi levantado como hipótese inicial que a ausência de cárie no grupo do sambaqui de Cabeçuda pode ser associada, com a presença de vibriões, que são bactérias não cariogênicas

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Os dentes humanos e sua anatomia: tecidos duros

A arcada dentária humana se aproxima da forma de uma parábola. A direção e o lado no qual os dentes estão posicionados servem de referência para seu estudo, sendo o lado esquerdo e direito, superiores e inferiores, anteriores e posteriores. Aos dentes são atribuídas as seguintes funções: mastigação (incisivo: cortar, caninos: dilacerar, pré-molares e molares: triturar), fonação, estética e suporte facial (WARWICK; WILLIAMS, 1979; HAM, 1967; BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2012).

A dentição humana é classificada como difiodonte, sendo caracterizada por duas dentições: primária ou decídua, comumente conhecida como “de leite” e secundária ou permanente. (WARWICK; WILLIAMS, 1979, STEELE; BRAMBLETT, 2007).

Há vinte dentes normalmente na dentição primária, dez localizados na mandíbula (arcada inferior) e dez localizados no maxilar (arcada superior). Os dois primeiros dentes de cada lado da linha média do maxilar e da mandíbula são chamados de incisivos centrais e próximos a eles estão os incisivos laterais. Localizados mais para trás da boca, estão os caninos, e em posição mais distal, há dois dentes molares de cada lado, nomeados de primeiro e segundo molar. Os dentes permanentes ou secundários se desenvolvem no ápice e entre as raízes dos primários. Na dentição secundária há em média trinta e dois dentes, dezesseis localizados no maxilar e dezesseis localizados na mandíbula. São semelhantes aos dentes primários, porém mais resistentes, e os dentes frontais também são os incisivos laterais e centrais e caninos. Logo atrás dos caninos se encontram os pré-molares, formados em espaços que foram inicialmente ocupados pelos molares primários. Atrás dos pré-molares existem três dentes molares, chamados de

primeiro, segundo e terceiro molar. O primeiro molar surge aos seis anos idade, o segundo surge por volta dos doze anos de idade e o terceiro molar, também conhecido como “dente do siso” surge mais tarde, geralmente aos dezoitos anos, embora possa não se formar ou erupcionar (HAM, 1967; WARWICK; WILLIAMS, 1979; BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2012)

A nomenclatura dentária foi criada para distinguir e caracterizar os detalhes do aparelho dentário. Quando descrevemos uma lesão, a localização pode ser descrita pela superfície do dente que está envolvida, e as classificações mais usuais das faces dentárias podem ser encontradas em Warwick e Williams (1979).

A raiz do dente é a porção do mesmo, que serve de fixação ou articulação, e fica mergulhada nos alvéolos maxilares e mandibulares. Contém um forame apical, por onde entram e saem vasos sanguíneos e terminações nervosas, sendo mais longa que a coroa, fato este que mantém o dente em equilíbrio. Os dentes podem ser uni, bi ou tri-radicular. As raízes possuem coloração amarelada e ausência de brilho, sendo revestida pelo cimento, que é um tecido conjuntivo calcificado, semelhante ao osso. Este cimento da raiz é separado do alvéolo ósseo por um tecido mole, chamado de ligamento periodontal, o qual possui como suas principais funções manter o dente suspenso em seu alvéolo e prover informação sensitiva por meio dos pressorreceptores. Há dois tipos de cimentos: acelular, o qual reveste a metade da parte coronal e não possui célula na sua raiz, e cimento celular, o qual possui células. Já a coroa dentária é a porção visível do dente quando este está implantado no seu alvéolo. Apresenta uma superfície lisa e polida revestida pelo esmalte. Todas as coroas são construídas segundo um mesmo plano arquitetônico (HAM, 1967, WARWICK; WILLIAMS, 1979, LANGMAN, 1970, BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2012).

O esmalte do dente se espalha gradualmente em direção ao colo, formando uma cobertura em toda a coroa do dente. Sendo a estrutura mais dura e densamente mineralizada do corpo humano, o esmalte contém 98% de sais orgânicos, estrutura cristalina de hidróxi-apatita, carbonato-apatita 2% a 4 % e matéria orgânica e água. É camada mais externa da superfície do dente e também a mais resistente sendo a última a se decompor no solo, sendo assim, o tecido mais preservado em sítios arqueológicos (HAM, 1967; WARWICK; WILLIAMS, 1979; LANGMAN, 1970; BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2012).

A dentina constitui a maior parte do dente. É um tipo especial de tecido conjuntivo calcificado e não é exposta ao meio exterior. É organizada em túbulos e canalículos, que desempenham papel importante na condução de estímulos através do dente. Contém 65% a 75 % de substâncias minerais (material inorgânico semelhante ao esmalte), 25% de substâncias orgânicas (proteínas do grupo dos colágenos) e 10% de água. Relaciona-se internamente com a polpa e externamente com o esmalte. Contém um canal central, que é chamado de cavidade da polpa (preenchido por tecido situado no centro do dente, onde se encontram os nervos e os vasos sanguíneos). Dentro se encontram células de tecido conjuntivo modificado chamado de odontoblastos, responsáveis pela formação da pré-dentina que é depositada na camada dentária interna. Com o tempo a pré-dentina se calcifica e se transforma na dentina definitiva. Os odontoblastos persistem durante toda a vida do dente. A dentina se diferencia em partes, tais como: dentina peritubular, que é a mais mineralizada e a dentina intertubular. A região adjacente à junção esmalte-dentina é menos mineralizada que a dentina intertubular e é chamada de dentina do manto, usada para se distinguir da restante que é a dentina circumpulpar. A dentina produzida pelo dente, logo após a erupção é a dentina secundária fisiológica, podendo

ser distinguida da primeira, dentina primária, por uma súbita mudança na direção dos túbulos da dentina (HAM, 1967; WARWICK; WILLIAMS, 1979; LANGMAN, 1970; BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2012).

2.2. Microbiota bacteriana e ecologia da cavidade oral

A cavidade oral é um ambiente úmido que é mantido a uma temperatura relativamente constante (34°C a 36 ° C) e um pH próximos da neutralidade, na maioria das áreas e, portanto, suporta o crescimento de uma ampla variedade de micro-organismos. O crescimento de microorganismos orais é influenciada por uma variedade de fatores, tais como temperatura, pH (o pH é mantido próximo da neutralidade entre 6,7 a 7,3, pois os microorganismos geralmente não toleraram valores extremos de pH da saliva), potencial de oxidação-redução, a disponibilidade de nutrientes e água, a anatomia de estruturas orais, fluxo salivar e substâncias antimicrobianas (MARCOTTE; LAVOIE, 1988).

A cavidade oral de seres humanos é habitada por diferentes espécies de bactérias, a maioria das quais é necessária para manter o equilíbrio do ecossistema do ambiente oral (MARSH, 2010). As bactérias acumulam-se tanto em tecidos orais duros quanto moles, ou em biofilmes/placa dentária. (GIBBONS; VAN HOUTE, 1975; MARSH, 2010).

Pouco é conhecido sobre a microbiota da cavidade oral saudável (PASTER et al., 2001). De acordo com Jorn et al. (2005), mais de 700 espécies ou filotipos de bactérias têm sido detectados no interior da cavidade oral. Algumas dessas espécies são consideradas comensais, o que é uma característica positiva da nossa microbiota saudável, enquanto outras são consideradas patogênicas. A colonização por bactérias patogênicas é provavelmente dependente da interação destas e organismos comensais. A presença de diferentes micro-organismos na cavidade oral ajuda a compor um ambiente ecológico, e a variação desta microbiota, ao longo da vida, relacionada aos hábitos e tipos de exposição ocorridas, em função da idade, susceptibilidade, contágios, etc.

produz diferentes condições que podem ser mais ou menos propícias à cárie e outros agravos nas estruturas anatômicas da boca (JORN et al., 2005).

De acordo com Gibbons e Van Houte (1975), Marcotte e Lavoie (1998) e Marsh (2009), diversos gêneros de bactérias anaeróbicas e aeróbicas constituem os segmentos da microbiota oral. Bacilos Gram-positivos, como *Lactobacillus*, (os principais sendo *L.gasseri*, *L. ultunensis*, *L. salivarius*, *L.rhamnosus*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum* e *L. gallinarum*) e *Staphylococcus*; bacilos Gram-negativos, como, *Leptotrichia*, *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Fusobacterium* e *Porphyromonas*. Cocos Gram-positivos, como, *Peptostreptococcus*, *Rothia dentocariose* e *Streptococcus*, ocorrem, porém os predominantes são as espécies *S. mitis*, *S. sanguis* e *S. salivarius*. Cocos Gram-negativos, como, *Neisseria* e *Veillonella* e mesmo espiroquetas como, *Treponema* e *Borrelia* são presentes na área do sulco gengival. Outros elementos descritos são os bastonetes Gram-negativos, principalmente os *Bacteroides* e *Spirillum* e as leveduras da espécie *Candida albicans*. Os *Enterococcus* são frequentemente presentes, porém, pouco numerosos. E Sims (1970) menciona que espécies de *Hemophilus*, incluindo *H. injiuenzae* e *H. parainjiuenzae*, podem em média se apresentar em mais de 107 organismos por mililitro de saliva. Por outro lado, a presença de vibriões, bastonetes Gram-negativos móveis, dotados de flagelos, na cavidade oral não são totalmente conhecidas, sendo apresentada por alguns autores. Assim sendo, estes micro-organismos podem, portanto, também ser pertencentes a microbiota bacteriana oral (GIBBONS; VAN HOUTE, 1975; ROSEBURY, 1952; COOLRIDGE, 1946; SMITH 1930, LOESCHE, 1985) especialmente em situações de exposição a algumas condições de ambiente e estilo de vida.

Os vibriões são bactérias alongadas e curvas, medindo 0,5 μm x 1,5-3,0 μm (BERGEY, 1975), que podem e colonizam a pele e membranas mucosas daqueles indivíduos que têm contato frequente, por exemplo, com os ambientes e materiais de águas salinas. No caso dos vibriões de água salina, podem ser ingeridos com alimentos crus ou mal cozidos, causando diarreia e até mesmo reações do periósteo, outras manifestações infecciosas, tais como, otite, infecções cutâneas, tem sido associadas a estas infecções, sendo transferidos para nosso corpo pelo contato com água salina, podem ser encontrados ocasionalmente ou permanentemente em tecidos humanos, dependendo das condições de vida e interações com o meio ambiente.

(MENDONÇA DE SOUZA, 1995). Tais tipos de bactérias são conhecidas e estudadas largamente pela sua importância epidemiológica, e entre estas podem ser citadas o *Vibrio parahaemolyticus*, espécie Gram-negativa, capsulada, que apresenta cepas patogênicas e anteriormente já respondeu por até 70% das infecções alimentares no Japão (BRAUDE; DAVIES; FIERER, 1986). Esta espécie pode ser facilmente destruída pelo calor, porém podem contaminar alimentos já cozidos pelo manuseamento ou transferido para seres vivos e matérias pelos insetos, principalmente moscas.

A maior biomassa de bactérias da cavidade oral é encontrada nas superfícies dos dentes, em biofilmes e no dorso da língua. As concentrações de bactérias na região do palato são mais baixas geralmente de 5 a 25 bactérias por célula epitelial. As concentrações de bactérias presentes na saliva podem variar durante o dia (GIBBONS et al. 1964) e cada bactéria possui uma característica dentro da cavidade oral (GIBBONS ET AL., 1964; GORDON; JONG, 1968; SOCRANSKY; MANGANIELLO, 1971). Por exemplo, *S. salivaris* coloniza preferencialmente a superfície dorsal da língua, enquanto que *S. sanguis* e *S. mutans* tem os dentes como seu habitat preferido. *S. mitis* são

predominantes colonizadores da mucosa bucal, enquanto que, as espiroquetas e os vibriões são principalmente colonizadores na área do sulco gengival. Lactobacilos estão associados principalmente em locais de retenção, como poços e fissuras oclusais (VAN HOUTE et al. 1972). Além da colonização das bactérias em diferentes locais, primeiramente é necessário que ocorra a aderência das bactérias no ambiente oral. A localização preferencial dos diferentes tipos de bactérias associado ao seu potencial cariogênico pode ajudar a explicar sua presença nos cálculos dentários, o tipo de distribuição de patologias associadas, e assim por diante (GIBBONS et al., 1964, GORDON; JONG, 1968; SOCRANSKY; MANGANIELLO, 1971)

De acordo com Rosan et al. (1985), Taubman (1992) e Curtis et al. (2005), a adesão microbiana aos tecidos do hospedeiro é determinada pela interação de adesinas bacterianas e receptores teciduais. A adesão significa a fixação ativa de uma bactéria a uma determinada superfície, que pode ser qualquer estrutura orgânica ou inorgânica, inclusive à superfície de outra bactéria, o que é chamado de co-agregação. Na adesão as bactérias podem se aderir a uma superfície mole, como a mucosa, ou à estrutura dura, mineralizada do dente. As adesinas são macromoléculas ligantes encontradas na superfície das bactérias, geralmente encontradas nas fibrilas ou nas fímbrias daquelas. Na superfície dos tecidos do hospedeiro existem moléculas receptoras que reconhecem as adesinas bacterianas e com elas interagem. Esta interação bioquímica forma pontes de ligação, que são as bases da aderência bacteriana. As adesinas comumente conhecidas são as lectinas, que são adesinas proteicas que possuem afinidade específica por carboidratos, elas só se fixam nos tecidos (mucosa ou superfície dental) em cujas superfícies existam o carboidrato e as adesinas hidrofóbicas. Existe um elevado grau de especificidade na interação entre as adesinas e os receptores. Essa especificidade explica

por que diferentes espécies bacterianas, mesmo pertencentes a um mesmo gênero, têm afinidades por diferentes estruturas da boca. Na aderência interbacteriana ou coagregação, que é a responsável por conferir volume à microbiota, uma bactéria pode se fixar à superfície de outra bactéria da mesma espécie (coagregação homotípica) ou, então, de espécies diferentes (coagregação heterotípica).

Os *Streptococcus* predominam nas placas bacterianas da boca, formando pares ou séries curtas quando presentes em meio sólido, ou séries longas ou agrupadas, quando presentes em caldo. Suas dimensões variam de 0,75 µm a 1,25 µm. Possuem parede celular grossa e membrana simples. São imóveis, já que não possuem órgãos de locomoção como flagelos (ZHOU; LI, 2015). Estas bactérias têm sido encontradas, tanto em superfícies de coroa dentária como radiculares, em indivíduos positivos ou negativos em relação à ocorrência de cárie (SCHIEE, 1994; NYVAD; KILIAN, 1990). Os estudos revelaram que o início da colonização pelos estreptococos se dá principalmente por três espécies: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sanguis*. Os indivíduos não portadores de cárie dentária são colonizados em maior número por *S. sanguis* e com reduzido do número de *S. mitis* e *S. mutans* que são micro-organismos que irão colonizar em maior número indivíduos que possuem cárie. Os números de *S. oralis*, por outro lado, são semelhantes tanto nos indivíduos que possuem cárie, quanto os que não possuem. É possível distinguir as espécies através parte da mucosa oral a qual colonizam (NYVAD; KILIAN, 1990).

A adesão microbiana ocorre em etapas, e começa pelo transporte de nutrientes e matéria orgânica à superfície do dente, ocasião em que ocorre à formação de uma camada de nutrientes. Em seguida há adesão dos micro-organismos à superfície do dente e seu crescimento, favorecido pela película nutritiva e principalmente na presença

de carboidratos em abundância. Ocorre intenso metabolismo no biofilme e há liberação de micro-organismos das superfícies, o que favorece sua desmineralização. A adesão microbiana pode ocorrer de duas distintas formas: reversível e irreversível. A primeira, por atração instantânea de micro-organismos à superfície do dente. Esta fase envolve o transporte inicial de uma bactéria à superfície do dente, mediada por processos químicos e físicos da superfície dentária que atraem ou repelem os micro-organismos, tais como a força de Van der Waals e a força eletroestática. A forma irreversível envolve reações biológicas específicas que promovem a aderência de micro-organismos (SCHEIE, 1994).

A maioria dos micro-organismos orais tem alta superfície de energia livre, o que indica que eles aderem preferencialmente às superfícies com alta energia livre como o esmalte dentário (WEERKAMP et al., 1989). Teoricamente, diminuindo a superfície de energia livre de dentes também se reduz a colonização. A maioria dos micro-organismos possui um vasto número de adesinas que se pode ligar quimicamente a receptores complementares que interagem na superfície (SCHIEI, 1994).

A técnica de fluorescência vital demonstra que o número de micro-organismos viáveis é menor no início (quatro horas) da colonização da superfície do dente do que mais tarde (vinte e quatro horas depois), nas fases da formação da placa, provavelmente devido a uma maior sensibilidade e acessibilidade para fatores antimicrobianos salivares contra os primeiros colonizadores (WEIGER et al., 1993). Esta última observação apoia a ideia de que, além de propriedades adesivas microbianas, as condições ecológicas do meio bucal favorecem a reprodução das bactérias e têm impacto decisivo na formação da placa dentária desde cedo (SCHEIE, 1994).

Em um estudo clínico realizado para a formação da placa dentária pela adesão e crescimento microbiano há o pressuposto quanto ao tempo necessário para atingir 10^6

micro-organismos, para aderência, seriam quatro dias, mas apenas 12h se o processo fosse de crescimento microbiano (ORSTAVIK, 1984). Contudo, outros autores discutem estes pressupostos, pois tanto a importância do crescimento, como o papel de aderência podem ser superestimados. As diferenças na formação de placas tornam-se evidentes durante a fase proliferativa 12h-24h, apoiando assim a importância do crescimento microbiano para a formação de placa dentária e pela sua diversidade composição (CRITCHLEY; BOWEN, 1970). Quando se considerar cálculos dentários por outro lado, vários fatores sistêmicos afetam tanto a quantidade quanto a velocidade de formação dos mesmos, em intervalo de 30 dias, indivíduos saudáveis podem formar depósitos mínimos ou quantidades de cálculo grandes, havendo diferentes fatores que contribuem para este processo (ORSTAVIK, 1984).

Dickschat (2009) concluiu que a formação de biofilmes também pode ser suprimida pela degradação enzimática de moléculas AHL, ou pela interferência de metabólitos secundários de outras espécies bacterianas que interagem com os sistemas de detecção de “quórum” de bactérias que se comunicam. Em seu trabalho, o autor apontou bactérias do gênero *Vibrio* como sendo auto-indutores de formação de biofilme bacteriano, ressaltando que o biofilme bacteriano é uma estrutura notável em que micro-organismos unicelulares organizam uma forma de vida multicelular. A arquitetura do biofilme é construída principalmente a partir de polissacarídeos extracelulares, fornecendo a base estrutural para a melhoria do abastecimento de nutrientes e proteção contra estresses ambientais. Em muitas bactérias a biossíntese destes polissacarídeos e a formação de biofilme, é chamado de “quorum sensing”, o qual envolve moléculas auto indutoras. Contudo, bactérias do gênero *Vibrio* são auto indutoras e também suprimem a formação de biofilme. A autoindução não é apenas responsável por

formação biofilme, mas também para muitos outros processos tais como a expressão fatores de virulência. O processamento intracelular de “quorum sensing” bacteriano podem envolver de maneira importante o complexo de cascatas reguladoras das moléculas auto indutoras, como para o gênero *Vibrio*, dando uma imagem clara de como a expressão de fatores de virulência e a formação de biofilmes é regulada por auto indutores dentro do gênero *Vibrio* (DICKSCHAT, 2009).

De acordo com Nunes et al. (2007), o “quorum sensing” pode dar propriedades distintas ao biofilme. Possui potencial para influenciar a estrutura da comunidade, estimulando o crescimento de espécies benéficas (ao biofilme) e inibindo o crescimento de competidoras.

2.3. Cálculos dentários: relações com a formação de placas e a dieta

A formação de cálculo dentário depende da formação de placa dentária/biofilme, sendo resultante da mineralização ocasionada pela deposição de sais de cálcio e fosfato no interior da matriz orgânica da placa (LAWIN-SCOTT; COSTERTON, 1995; SCHIEE, 1994; KOLENBRANDER, 2000). A formação de cálculo pode não ter relação direta com a formação de cáries e outros processos infecciosos, já que na prática, séries populacionais com grandes volumes de cálculos e altas frequências dos mesmos, podem ter índices muito baixos de cárie dentária. Alguns estudos epidemiológicos apontam que as propriedades físicas dos alimentos, como adesividade e solubilidade, podem influenciar o potencial cariogênico sendo alimentos mais adesivos ou com tempos prolongados de permanência no ambiente oral mais freqüentemente relacionados a eventos severos de desenvolvimento de cárie (CALDWELL, 1970; WHITE, 1975; KLEINBERG ET AL., 1981).

O conjunto diversificado de espécies de bactérias que colonizam a cavidade oral e as suas interações permite a maturação da placa dentária, e ajudam a determinar sua posterior mineralização, formando o cálculo (SCHIEE, 1994; HILLSON, 1996; KOLENBRANDER, 2000). Durante o complexo processo de adesão, está descrito que as células bacterianas alteraram os seus fenótipos em resposta à proximidade de uma superfície. Durante o primeiro estágio de formação do cálculo dentário, as bactérias sésseis encontram-se em uma justaposição estável com as células da mesma espécie e com as de outras espécies. Diferentes bactérias presentes no cálculo dentário respondem às condições de microambiente específicas com diferentes padrões de crescimento, e este cálculo se desenvolve gradualmente (FLETCHER, 1991; HAMILTON, 1987;

LAWIN-SCOTT; COSTERTON, 1995; LAWRENCE; KORBER; CALDWELL, 1995).

O processo e a velocidade de formação do cálculo dentário e sua velocidade se dão de forma variada entre os humanos, contudo, a dieta parece ser um fator de grande influência. Dietas menos ricas em açúcar e com conteúdo elevado de minerais, além de hábitos alimentares que não estimulam eventos múltiplos de ingestão, ao manterem o pH salivar alcalino, parecem estimular a precipitação de fosfato de cálcio e assim aumentam a formação de cálculo (GAARE; ROLLA, 1989). Alguns achados epidemiológicos sugerem que a população masculina é mais acometida por cálculos dentários do que a população feminina e se apresentam em maior frequência em indivíduos com idades mais avançadas (ANEROUD; LÖE; BOYSER, 1991).

Os cálculos dentários extraídos de indivíduos atuais, quando examinados por diferentes técnicas de amplificação de imagem permitem visualizar a diversidade de microbiota que os constitui, além de mostrar sua intrincada arquitetura. Estes podem ser diferenciados em cálculo dentário supragengival e subgengival. O cálculo supragengival é o resultado dos depósitos bacterianos nos dentes, que também são influenciados pela secreção da glândula salivar e desta forma a maior quantidade de cálculo supragengival é normalmente encontrada na superfície vestibular dos molares superiores adjacentes ao ducto parótideo e nas faces linguais dos incisivos inferiores adjacentes ao ducto submandibular. O cálculo subgengival é formado apicalmente à margem gengival e normalmente não é visível, sendo detectado com a exploração da sonda periodontal (LOESCHE, 1994).

De acordo com Wilson (2001), do ponto de vista epidemiológico, existe forte associação entre cálculo dentário, cárie e periodontites, mas não há evidências que

implique o cálculo dentário como causa primária de cárie, entretanto, o cálculo possui potencial para concentrar tanto toxinas, quanto nutrientes, e isto pode influenciar a ecologia bacteriana ou o biofilme. O autor menciona que a remoção tanto do cálculo subgengival, quanto dos depósitos bacterianos subgengivais, permite manter um estado de saúde periodontal por longos períodos de tempo. Não existem estudos ao longo prazo que tenham avaliado os resultados da remoção do cálculo.

Em paleopatologia, os estudos sobre cálculos dentários são encontrados de maneira fragmentada na literatura, porém, de uma perspectiva geral, os cálculos dentários são relatados como abundantes, tanto quanto ao número de dentes como quanto ao número de indivíduos acometidos (MENDONÇA DE SOUZA; WESOLOWSKI; RODRIGUES-CARVALHO, 2006; LUKACS, 1989; WESOLOWSKI, 2000; WESOLOWSKI, 2007; LARSEN, 1981, PREUS et al., 2011; WARINNER et al., 2015).

De acordo com Preus et al. (2011), há um crescente reconhecimento dos cálculos dentários arqueológicos como fonte de informações importante sobre o tipo de dieta e condição de saúde oral em grupos pré-históricos. Leigh (1925) realizou os primeiros estudos com cálculos dentários arqueológicos, contudo, este tipo de estudo, começou a ganhar mais importância no campo da arqueologia no início dos anos 1960 (ROWLES et al., 1961; BROTHWELL, 1972; KLEPINGER et al., 1977). Ao longo dos anos, cálculos dentários arqueológicos foram utilizados para correlacionar métodos de subsistências e tornou-se importante para análise de vestígios humanos (DOBNEY; BROTHWELL, 1986; DOBNEY; BROTHWELL, 1988; LIEVERSE, 1999; ARENSBURG, 1996; DOBNEY, 1994).

O trabalho pioneiro de investigação microscópica de cálculos dentários arqueológicos foi realizado por Dobney e Brothwell (1986), que revelou uma grande diversidade de micro-organismos bem preservado e microfósseis alimentares no âmbito da saúde bucal arqueológica. Pap et al. (1995), Vandermeersch et al. (1994), Arensburg (1996), revelaram a presença de microfósseis bacterianos bem preservados em cálculos dentários de homínídeos datados do período do Mioceno empregando microscopia eletrônica de varredura. Mais recentemente, foi realizada a primeira técnica de investigação biomolecular para identificar patógenos orais em cálculos dentários (PREUS et al., 2011).

2.4. Cárie dentária

Fejerskov (1997) postula que a cárie dentária é uma doença multifatorial. O autor sugere que sem a presença da placa, não é possível o aparecimento de cárie. Em contraponto, a placa não chega a ser considerada fator determinante para a formação de cárie, sendo formação da placa na superfície do dente um fenômeno fisiológico determinado pela biodiversidade da cavidade bucal.

Oliveira Lima (2007) conceitua cárie como um processo anormal. Este propõe que certos grupos antigos que viviam em condições naturais não desenvolviam lesão no esmalte que pudesse ser considerada cárie dentária. Segundo o autor, mesmo apresentando os elementos necessários para desenvolver cárie, viveriam inseridos em uma biodiversidade comandada pela natureza, mantendo equilíbrio físico-químico do ambiente da boca e pouco sujeito às cáries, assim sendo a mudança da forma natural para a forma domesticada dos alimentos teria gerado um desequilíbrio da biodiversidade bucal, possibilitando o desenvolvimento de cárie dentária. Esta interpretação não encontra total respaldo nos estudos de paleopatologia dentária, já que muitos grupos antigos desenvolveram diferentes frequências desta lesão. Entretanto, as mudanças culturais, principalmente de dieta, seguramente trouxeram um aumento na prevalência desta doença, principalmente após o advento da agricultura e depois da industrialização de alimentos (LUKACS, 1989)

A cárie dentária é descrita como uma doença multifatorial, infecciosa, onde fatores como a anatomia da cavidade oral, a resistência dentária, a composição da saliva e a dieta são tão importantes quanto a formação da placa bacteriana e os micro-organismos que causam a doença. A cárie é resultado de um processo que aparece após algum tempo da presença e da interação destes fatores (OLIVEIRA LIMA, 2007;

PEREIRA et al., 2010). Os locais mais afetados costumam ser fissuras, fóssulas, sulcos e faces proximais, incluindo superfícies radiculares (TANZER, 1995).

Existem duas abordagens teóricas distintas quanto ao agente microbiano causador da doença cárie: os conceitos de agente espécie-específico - complexo *Streptococcus mutans* (LOESCHE, 1986); e, a de agente composto - microbiota bacteriana acidogênica e acidúrica composta (KLEINBERG, 2002).

Na década de 40, a cárie dentária foi considerada como uma doença infecciosa e transmissível, mas os principais micro-organismos causadores deste tipo de doença, estreptococos e lactobacilos, só foram identificados na década seguinte e os mecanismos imunológicos da doença só foram identificados na década de 80, considerando-se o devido impacto na Saúde Pública (PEREIRA et al., 2010).

A cárie dentária tem sido descrita como uma doença crônica que progride lentamente na maior parte dos indivíduos. Na ausência de tratamento, ocorre uma progressão da lesão, que é muitas vezes representada em uma escala linear que vai desde a desmineralização até a destruição total do dente (FEJERSKOV et al., 2008). A suscetibilidade à cárie deve diferenciar entre a suscetibilidade do indivíduo como um todo e a do próprio dente.

Do ponto de vista bioquímico, o processo de cárie é muito complexo. Processos metabólicos estão constantemente ocorrendo na placa dentária, como resultado de atividade microbiana (NEWMAN et al., 1979). Muito embora o micro-organismo não seja o único a participar no desenvolvimento da lesão (MARSH, 1994; NYVAD, 1993), e somente a sua presença não explique a variação nas cáries, sua participação é inquestionável e indispensável, já que a lesão de cárie passa pelo metabolismo bacteriano. Este metabolismo culmina com a formação de ácido que promove a desmineralização do esmalte, desencadeando um processo fisiológico (MANJI et al.,

1991). Os fatores etiológicos primários para que ocorra a cárie dentária é a microbiota da placa dental, os substratos originados da dieta e hospedeiro suscetível (KEYES, 1960)

A Acidificação do biofilme, decorrente da fermentação de diversos carboidratos, inibe o crescimento de diversos micro-organismos. Mudanças na atividade bacteriana e pH no biofilme, quando, por exemplo, ocorre o aumento de carboidratos ou redução da depuração salivar podem mudar a atividade de cariogênese (METEE et al., 1993). De acordo com Tadashi e Nyvad (2008), a placa dentária representa um ecossistema microbiano em que as bactérias não-*mutans* são os principais micro-organismos responsáveis pela manutenção da estabilidade dinâmica sobre a superfície do dente. O ácido microbial e a "baixa de pH" desempenham um papel crítico para desestabilizar a homeostase da placa, facilitando a desmineralização. Uma vez que o meio ácido foi estabelecido, *Streptococcus mutans* e outras bactérias podem aumentar e promover o desenvolvimento de lesões, tendo um ambiente caracterizados por “perda de mineral”, Assim, altas proporções de *S. mutans* e/ou outras bactérias acidófilas podem ser considerado biomarcadores de rápida progressão da cárie. Bactérias como os *Lactobacillus* spp. não são capazes de se aderir e acumular em superfícies hígidas pouco retentivas, mas aumentam em proporção em microbiotas ecológicas de alta acidogenicidade assim como o *S. mutans* que possui afinidade pelo meio ácido, logo, a ausência ou baixa de *Lactobacillus* spp. indica a baixa acidez e talvez um baixo risco de cariogênese (LOESCHE, 1986).

A cavidade oral é essencialmente estéril no momento do parto, mas o desenvolvimento da microbiota bacteriana bucal é relativamente rápido, assim sendo durante as primeiras 24 horas de vida extra-uterina a boca é contaminada por várias espécies de bactérias até o surgimento dos dentes (SOCRANSKY; MANGANIELLO,

1971). Logo ao nascimento as crianças adquirem uma série de micro-organismos que vão compor a microbiota bucal, transmitidos através da saliva por indivíduos com os quais as crianças vão manter contato, como pai e mãe (GRONROOS et al., 1998; KOHLER et al., 1983; LI et al., 1983). Os colonizadores iniciais das superfícies dos dentes constituem uma parte importante da microbiota oral, principalmente *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. mitis* (NYVAD; KILIAN, 1987). Juntas, estas três espécies de estreptococos podem ser responsáveis por 56% do total da micromicrobiota inicial (NYVAD; KILIAN, 1987). Contudo, *Streptococcus mutans* corresponde a apenas 2%, ou menos, da população inicial de estreptococos. A chance da colonização por *S. mutans* só aumenta com a erupção dos dentes, uma vez que esta espécie depende de superfícies que não descamam para se acumular na cavidade oral. Nas lesões da cavidade da dentina, *Streptococcus mutans* estão associadas com progressivas fases de cárie (NYVAD; KILIAN, 1990). Existe um fenômeno conhecido como “janela da infectividade” que corresponde ao período em que as crianças entre 1,5 e 2,5 anos de idade apresentam maior risco de aquisição de *S. mutans* (CAULFIELD et al., 1993). Não se sabe ao certo o que determina a ocorrência desta janela de infectividade na primeira infância. Sabe-se que entre 19 a 32 meses ocorre a erupção dos molares decíduos, os quais apresentam superfícies oclusais retentivas. É sugerido que com a erupção dos dentes molares com superfícies retentivas virgens, possa favorecer a colonização por *S. mutans* (CAULFIELD et al., 1993; CAULFIELD et al., 2000). Esta janela de infectividade só fecharia porque, uma vez completa a erupção dentária, e estabelecida uma microbiota indígena comensal nas superfícies recém-irrompidas, esta microbiota atuaria como uma barreira ecológica competitiva para o estabelecimento de *S. mutans* nas placas dentárias (CAULFIELD et al., 2000).

A microbiota é composta por uma série de bactérias acidogênicas e acidófilas, entre as quais as mais conspícuas são o complexo de *Streptococcus mutans*, lactobacilos, cepas acidogênicas e acidúricas de *Neisseria* sp., *Bacteroidis* sp., *Actinomyces* sp. e *Streptococcus* não-*mutans*, às quais em conjunto, e em associações variadas, podem provocar cárie quando as condições ecológicas da cavidade oral favorecem (KLEINBERG, 2002).

Todavia, outro fator que também modula a presença de cárie é a dieta. Dietas ricas em açúcares e prevalências altas de cáries são eventos relacionados (NEWBURN, 1982). De acordo com Thylstrup & Fejerskov (1995) a cariogenicidade da dieta é determinada pela presença de açúcares que servem de substrato para que os micro-organismos da cavidade bucal sintetizem polissacarídeos extracelulares com um importante papel na formação da placa e, também, na produção de ácidos orgânicos, que promovem a desmineralização do esmalte e podem desencadear o processo de cárie. Contudo, é importante lembrar que as bactérias do biofilme precisam se adaptar as variações drásticas dos nutrientes disponíveis, como por exemplo, a ingestão de açúcar (AJDIC et al., 2002).

De acordo com Ditterich (2004) diversos pesquisadores têm apontado o açúcar como principal fator dietético na etiologia da cárie dentária e consideram a cárie uma “doença da civilização”, vinculada à ingestão de alimentos processados. Para Sheiham (1984) o aumento da cárie esteve associado ao aumento no consumo do açúcar, pois em todos os países nos quais a prevalência da cárie aumentou, houve também o aumento no consumo “*per capita*” desse produto. Todos os açúcares comuns da dieta alimentar (sacarose, glicose, frutose e lactose) são utilizados no metabolismo de energia de muitas bactérias da placa, estando portanto sujeitos a serem fermentados por micro-organismos (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995). Alimentos amiláceos, na medida em que os

amidos são carboidratos e permanecem frequentemente aderidos aos dentes e mucosas favorecendo a formação de placas, também são apontados como cariogênicos (MANDEL, 1995).

A suscetibilidade do indivíduo para o processo de desencadeamento de cárie pode ser determinada por fatores extrínsecos, como o fluxo, composição e capacidade tampão da saliva para tamponar a acidez do meio ambiente dentro da boca; o grau de mineralização dos dentes; até mesmo as condições como a estrutura sociocultural na qual o indivíduo está inserido, além de aspectos hereditários e imunológicos (OLIVEIRA LIMA, 2007)

De acordo com Marcotte e Lavoie (1988), em relação aos fatores imunológicos, a imunoglobulina A salivar (SIgA), constitui o principal mecanismo de defesa imunitário específico na saliva, e pode desempenhar um papel importante na homeostase da microbiota oral. Estes anticorpos que são reativos contra uma variedade de bactérias, são detectáveis na saliva, podendo controlar a microbiota oral por reduzir a aderência de bactérias à mucosa oral e dentes. A principal função de anticorpos (SIgA) parece ser a de limitar a aderência microbiana, bem como a penetração de antígenos estranhos na mucosa (BRATTHALL; GIBBONS, 1964; JR MCGHEE et al., 1992; MCNABB; TOMASI, 1981). Contudo, até o momento, os estudos que avaliaram o papel da SIgA na ecologia microbiana da cavidade oral, deu resultados contraditórios. Em experiências in vitro têm demonstrado que a SIgA podem inibir (KILIAN et al., 1981; REINHOLDT; KILIAN, 1987) ou promover (KILIAN et al., 1981; LILJEMARK et al., 1979) a adesão de bactérias orais nos dentes. As experiências com modelos animais mostraram que a presença de IgA salivar induzido contra *Streptococcus mutans* leva a uma redução na colonização pela bactéria bem como na prevenção de cáries (MICHALEK; CHILDERS, 1990). Os estudos mais

recentes, no entanto, indicam que a imunidade não é mantida (RIVIERE et al., 1992). Humanos deficientes em IgA parecem ser mais ou menos susceptíveis à cárie e doenças periodontais (ROBERTSON et al., 1978; ROBERTSON et al., 1980).

2.5. Estudos sobre saúde bucal em populações antigas

Segundo Hilson (1996), a análise das alterações e patologias das peças dentárias possibilita inferir aspectos de subsistência, estilo de vida e processo saúde-doença de grupos humanos passados, cujo significado paleoepidemiológico é de grande interesse para a pré-história. O aparato dentário interage com eventos da vida cotidiana dos indivíduos, pois estão envolvidos em procedimentos culturais estéticos e laborais, além de atuar diretamente na alimentação. A preservação do esmalte dentário é favorecida mesmo em condições relativamente diversas, nos sítios arqueológicos, e desse modo os dentes são um material de grande interesse para estudo, e tem sido frequentemente utilizados nas pesquisas paleopatológicas e paleoepidemiológicas.

Os grupos pré-históricos do Velho Mundo vem sendo intensivamente estudados há longo tempo. Dentre eles um dos mais interessantes é o chamado povo Natufiano, por representar um grupo muito antigo do Oriente Próximo, um dos primeiros que viveram a transição para a sedentarização e a adoção da agricultura como economia básica na produção de alimentos. Este grupo tem recebido uma atenção especial, pois o desenvolvimento da dieta neste período está intimamente relacionado com o desenvolvimento da produção de alimentos (SILLEN, 1984). Consequentemente ao estudo da dieta dos Natufianos e de outros povos pré-históricos, existem pesquisas relacionadas à sua condição de saúde dentária.

Smith (1972) comparou espécimes de Natufianos de três locais diferentes, Kebara , El Wad e Eynan, testando hipóteses relativas ao tipo de dieta e os métodos de preparação dos alimentos destes grupos pré-históricos, comparando as taxas de desgaste nos dentes examinados. A autora observou que no sítio de Kebara a frequência de cárie, doença periodontal e desgaste dentário foram menores e considerou que as diferenças

no conteúdo de vegetais da dieta entre os indivíduos recuperados era o principal fator da diferença observada entre os sítios. Hershkovitz et al. (2001), realizou uma análise comparativa de dentes permanentes e decíduos de amostra do Pleistoceno Médio buscando mais conhecimentos sobre a linhagem evolutiva humana, descobrindo inclusive dentes com algumas afinidades morfológicas que remetem aos membros da linhagem evolutiva Neandertal.

Eshed e Hershkovitz (2006) estudaram esqueletos da população de caçadores-coletores Natufianos (10.500-8.300 AC) e os esqueletos da população Neolítica (8.300-5.500 AC) para avaliar os impactos das diferenças dos padrões de dieta e de subsistência através da análise de patologia dentária.

Estes, como outros autores, observaram que a transição da caça e coleta para uma economia produtora de alimentos não promoveu mudanças na saúde dental, como se acreditava anteriormente, contrariando a primeira síntese sobre a transição para a agricultura apresentada em Cohen & Armelagos (1984). As mudanças nas técnicas de preparação de alimentos explicam grande parte da variação na condição dentária em populações antes e depois da revolução agrícola naqueles povos Natufianos. Pesquisas com material esquelético de diferentes origens do passado indicam que a frequência de cárie aumentou quando associada ao tipo de dieta decorrente do cultivo de alimentos, em muitos casos, mas esta mudança atingiu valores significativamente altos após a introdução de alimentos ricos em açúcar livre. Este fato, no entanto, é muito recente e se deu apenas após a revolução industrial, tal como outros fatos da transição epidemiológica (LARSEN, 1981; LUCKS, 1989; LARSEN et al., 1990). Por esta razão, a frequência de lesões cariosas, não podem ser simplesmente indicativas de sedentarismo ou domesticação (WESOLOWSKI, 2000).

Em estudos recentes, Warinner et al. (2015), analisou estudos feitos em cálculos dentários para caracterizar a microbiota oral antiga confirmando que este tipo de estudo tem se mostrado um reservatório abundante de informações. Os cálculos preservados não só os vestígios do tipo de dieta, mas também os micro-organismos e seu estudo tem se aprimorado. A autora lembra que a investigação da microbiota humana possui um papel fundamental para o entendimento da saúde e da doença crônica, levantando questões sobre as mudanças na ecologia microbiana, sua diversidade e função ao longo do tempo. A autora também menciona que existe um vasto campo de possibilidades futuras para a elucidação da relação evolutiva íntima entre seres humanos e seus micro-organismos.

No que se refere especificamente a cárie, Preus et al. (2011), realizaram uma investigação em 1996, em cálculos dentários, objetivando identificar *Streptococcus mutans* através da análise imuno-histoquímica. Em 2011, a preservação do DNA da bactéria nos cálculos dentários foi confirmada por microscopia eletrônica de transmissão marcada por ouro, sendo identificadas também diferentes espécies, tais como, *Streptococcus mutans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus gorgonii*.

No Brasil, diversas pesquisas (SALLES CUNHA, 1963; UCHÔA, 1973; MENDONÇA DE SOUZA, 1995; RODRIGUES-CARVALHO, 1997; RODRIGUES-CARVALHO; MENDONÇA DE SOUZA, 1998; WESOLOWSKI, 2000; HAUBERT et al., 2004; WESOLOWSKI, 2006; MENDONÇA DE SOUZA; WESOLOWSKI; RODRIGUES-CARVALHO, 2006; WESOLOWSKI et al., 2007; entre outros) trataram do estudo da paleopatologia dentária, em especial da cárie dentária, em grupos pré-históricos, tanto em séries esqueléticas de acampamentos litorâneos, quanto em séries

oriundas de sambaquis típicos. No último estudo (WESOLOWSKI, 2007), feito com o objetivo de recuperar e analisar micro-resíduos vegetais retidos em cálculos dentários, foram identificados os microfósseis bacterianos pela primeira vez em material arqueológico estudado no Brasil.

Mendonça de Souza (1995) já havia proposto que existem restrições quanto à compreensão do processo saúde-doença dos grupos pescadores-coletores-caçadores do litoral brasileiro, sobretudo no que diz respeito a saúde oral, por fatores limitantes, tais como, a falta de informações sobre a totalidade dos componentes da dieta destes grupos. Outro fator seria o reducionismo excessivo dos modelos paleopatológicos, que relacionavam estratégias de subsistência e estados fisiopatológicos orais específicos. Com o advento de novas possibilidades, como a produção de dados sobre a dieta (amido) e a microbiota oral em cálculos dentários, os estudos paleoepidemiológicos sobre a cárie dentária também ganharam novas perspectivas.

A intensiva ocupação do litoral por pescadores-coletores-caçadores posteriormente foram substituídos por grupos horticultores e disseminação de alimentos cultivados e ricos em carboidratos nos últimos anos sobre as populações do passado do Brasil, levam a hipótese da ocorrência também de uma transição na saúde, a qual significaria mudança na patocenose, com possível aumento das frequências de indicadores inespecíficos de estresse e patologias, como cáries e infecções, tal como foi sugerido em Cohen e Armelagos (1984), Goodman et al. (1984a, 1984b), Larsen (1981, 1984), e Larsen et al. (1990). Neste cenário o trabalho de investigação da saúde dentária vem buscando comparar ao longo do tempo, considerando entre outros aspectos, esta transição. Assumindo que o uso da cerâmica seria um indicador da domesticação de plantas, Wesolowski (2000) e Neves e Wesolowski (2002) analisaram alterações

fisiopatológicas associadas com uso desta tecnologia, supondo que as frequências de lesões dentárias se apresentariam diferentes nos grupos sem cerâmica quando comparados aos com cerâmica, assumindo que a presença da tecnologia cerâmica seria um indicativo também de mudanças na dieta. Contudo, os resultados encontrados não mostraram diferenças entre as séries esqueléticas oriundas de sítios litorâneas com cerâmica e aquelas provenientes de sítios sem cerâmica, o que levou os autores a confirmarem que a cerâmica, nestes casos, não significava que os grupos fossem horticultores, ou usassem alimentos domesticados, a tal ponto de ter aumento em suas frequências de cárie. Mais tarde em sua tese de doutorado e trabalhos subsequentes (WESOLOWSKI et al., 2007) a mesma autora e colaboradores provaram que a associação de dieta com cárie era válida, a partir de microrresíduos de alimentos amiláceos encontrados nos cálculos dentários.

Entretanto, apesar da confirmação da presença de frequências elevadas de cáries estivessem associadas à presença e consumo de amidos, principalmente de um tipo especial e muito adesivo aos dentes (inhame, *Dioscorea* sp.), observou-se no mesmo trabalho (WESOLOWSKI et al. 2007) e em outros existentes na literatura, que a frequência de cáries podia variar em grupos onde se detectou amidos nos dentes, confirmando tal como preconiza a literatura odontológica que a cárie depende de diferentes fatores e circunstâncias. Portanto, a presença, mas principalmente a ausência de cáries, tal como preconiza a literatura sobre os Natufianos e outros grupos, deveria ser correlacionada não apenas aos alimentos, mas à presença de outros fatores, sendo o principal deles a biota e ecologia da cavidade oral.

Salles Cunha (1963) um autor pioneiro da paleopatologia dentária no Brasil, ao analisar 1329 dentes provenientes do sambaqui de Cabeçuda, relatou a ausência do processo cariogênico em todos os dentes analisados, sendo este resultado confirmado

posteriormente. Um novo cenário surgiu com estes resultados, pois só havia registros de baixa frequência de cárie, sendo este o primeiro relato de um grupo livre de cárie da pré-história do Brasil. Alguns anos mais tarde Mendonça de Souza (1995) levanta a hipótese da possível presença de bactérias do tipo vibriões de água salina na cavidade oral dos povos de sambaquis, especialmente aqueles cujo estilo de vida fosse mais intimamente relacionada à questão do uso e exposição ao ambiente aquático litorâneo, expresso no uso e consumo de materiais oriundos das lagunas e do mar, tais bactérias estão naturalmente presentes.

Estudando os mesmos dentes, anos depois em sua dissertação de mestrado Rodrigues-Carvalho (1997) confirmou no sambaqui de Cabeçuda a ausência de lesões cariosas e baixas ocorrências dos outros processos dento-maxilares, exceto o cálculo dentário e o desgaste. A perda dentária em vida foi observada principalmente em homens, nos incisivos inferiores, sugerindo uma causa cultural como o uso de adorno labial (RODRIGUES-CARVALHO; MENDONÇA DE SOUZA, 2003) e a partir de seus resultados as autoras sugerem uma alimentação uniforme para o grupo, hipocalórica e de baixo impacto na saúde oral. As primeiras tentativas de identificação de amidos e cálculos dentários em no sambaqui de Cabeçuda mostraram poucos amidos domesticados, como o inhame e as batatas, sugerindo o uso predominante de alimentos vegetais selvagens (comunicação pessoal, FIGUEIREDO, A.C. – dissertação de mestrado em andamento em Saúde Pública/ ENSP).

A ausência de cáries em uma série relativamente grande de dentes examinados surpreende, sendo provável que mesmo na ausência de dieta fortemente cariogênica outro fator deveria ser buscado para explicar os resultados. A hipótese de uma ecologia bucal não favorável à carie, continua a ser considerada para estes grupos pré-históricos brasileiros, motivando o presente estudo.

2.6. Povos construtores de sambaqui: sítios arqueológicos, cultura e ambiente

Acredita-se que o nome “sambaqui”, dado a este tipo de sítio arqueológico existente no Brasil, seja originado de uma palavra de origem Tupi, a qual significa “amontado de conchas” (PROUS, 1993; GASPAR, 2004). Esta interpretação deriva do fato de serem estes sítios constituídos por construções geralmente em forma de morrotes, constituídas em grande parte por conchas, ou seja, carapaças de moluscos. Estes sítios foram construídos intencionalmente por grupos de pescadores-coletores-caçadores que habitaram parte do litoral brasileiro no período pré-colonial (GASPAR, 2004; GASPAR et al., 2008).

Assim sendo, sambaquis são sítios pré-históricos formados por amontoados de conchas associadas com sedimentos, restos faunísticos e de vegetais, onde podem ser encontrados objetos e artefatos, além de enterros humanos. São encontrados em diferentes partes do mundo. Com diferentes usos, formatos e datações recebem denominação genéricas de “shell mounds” ou “shell middens”, além de termos equivalentes em outras línguas, como por exemplo, “conchales” em espanhol. No entanto, é no Brasil que se encontram as maiores concentrações destes sítios arqueológicos e também alguns dos maiores já construídos. Neste território, por outro lado, há sítios construídos com conchas de diferentes tipos e em diferentes lugares, ao longo do litoral e dos grandes rios. Mas o conjunto de sítios, mais tipicamente conhecidos pela denominação sambaqui, é encontrado ao longo da estreita faixa litorânea entre as regiões Sul e Sudeste do Brasil (GASPAR, 2004; GASPAR et al., 2008).

Neles são encontrados vestígios de culturas pescadoras, coletoras e caçadoras que viveram entre cerca de 8.000 e 1.500 anos atrás. Utensílios, ferramentas, adornos, restos

alimentares, cinzas e carvões de antigas fogueiras, além de sepultamentos humanos, objetos que provavelmente foram usados para fins de rituais, além de vestígios de antigas cabanas (ANDRADE LIMA, 2000), tem servido de base para a descrição de seu estilo de vida, economia e cultura.

Em relação à origem destes sítios, no século XIX, os pesquisadores se dividiam entre duas vertentes: “naturalista” e “artificialista”. A vertente “naturalista” apontava os sambaquis como formações naturais, resultantes do nível marinho, como o recuo e avanço do mar, ação dos ventos sobre as conchas que teriam sido carreadas passivamente formando os amontoados. Nesta perspectiva os sambaquis eram vistos como “jazidas” naturais (KLOKLER, 2001). A vertente “artificialista” postulava a influência antrópica na construção dos sambaquis. Junto a esta vertente, havia duas concepções. A primeira consistia na ideia do sambaqui como local para acúmulo não-intencional de lixo sendo associado à falta de cuidados dos grupos que habitavam locais próximos, chegando a ser comparados aos sítios conhecidos como *shell middens*, que são encontrados em outros países, como, Dinamarca e os Estados Unidos. A segunda era baseada na percepção do sambaqui como uma construção intencional, reflexo da cultura e organização social do sambaquieiros que além de construí-los voltados para funções ritualísticas, os utilizavam como local de moradia. À medida que os estudos sobre sambaquis avançavam, a vertente “naturalista” se mostrou geologicamente improvável devido a forma de deposição antrópica dos sedimentos que constituem estes sítios, assumindo a vertente “artificialista” como a mais provável. A partir daí observou-se que desempenhavam diversas funções, como, local de enterramento dos indivíduos que ali habitavam, local de moradia e descarte de restos alimentares (GASPAR, 2004; GASPAR et al., 2008; GUIMARÃES, 2003).

Os grupos construtores de sambaquis possuíam atividades ritualísticas, e hoje sabe-se que grande parte dos sambaquis já escavados foram construídos para servir como local de sepultamento dos indivíduos vivam aquele estilo de vida. De acordo com alguns estudos feitos em sambaquis, os indivíduos podiam ser enterrados com adornos e artefatos de uso cotidiano, persistindo nos sítios lâminas de machados feitas de pedra, pontas ósseas, quebra-coquinho entre outros artefatos de pedra, adornos como colares feitos de dentes de tubarões perfurados e outros animais, conchas, ossos de peixe, etc (GASPAR, 1994).

Estes sítios possuem hoje formas e dimensões variáveis que resultam de sua construção, mas também de sua erosão e uso posteriores, podendo ser semiesféricos, cônicos, alongados, arredondados ou achatados. No estado de Santa Catarina, Brasil, em particular, estes sítios alcançam grandes dimensões, podendo medir até mais de 30m de altura por centenas de metros de extensão. Construídos em áreas de manguezais, em restingas, borda de lagunas, próximo de praias abrigadas e baía, estuários de rios, em muitos casos ficam expostos a inundações periódicas, ao efeito das marés e outras influências das águas salinas, ou às inundações provocadas pela alta pluviosidade dos ambientes tropicais quentes e úmidos onde se localizam, principalmente no verão (HEREDIA; BELTRÃO, 1980).

A localização destes sítios aponta para uma estratégia de subsistência. Em todo o mundo ela está associada a busca por locais que ofereciam alimentos abundantes e constantes, marcando um ciclo em que os grupos humanos passaram a buscar junto aos grandes corpos de água a sua fonte de subsistência. Isso na Europa caracterizou o chamado Mesolítico, quando os grupos humanos começaram a fixar-se mais à terra e mesmo sem ter adotado formas de produção baseada na domesticação de plantas ou animais, deixaram de ser tão móveis. No Brasil os povos sambaquieiros encontravam

neste ambiente litorâneo uma oferta abundante e constante de proteínas na forma de moluscos, peixes, mamíferos aquáticos e ainda diferentes tipos de caça (GASPAR, 2004, HEREDIA; BELTRÃO, 1980; GIANNINI et al., 2010). Mas também encontravam vegetais e outros recursos econômicos importantes, e por esta razão estes grupos persistiram dominando o litoral do Brasil por milhares de anos, tal como refere Gaspar (2004), verdadeiros “soberanos da costa”. A localização dos sítios próximos a corpos de água salina oferecia alimento abundante, o que reforça a interpretação de que o sambaqui poderia ser um local de moradia (TENÓRIO, 1999), embora raros sítios mostrem evidência de habitações.

A fartura e a disponibilidade permanente de alimento, além de minimizar a mobilidade destes grupos, reduzia também a necessidade de obtenção de recursos alternativos, favorecendo o sedentarismo independente da produção de alimento domesticado, como as horticulturas, e oferecia oportunidade para a formação de grupos maiores (ANDRADE LIMA, 2000). Embora haja muitas diferenças entre os sambaquis, sugerindo que não viviam todos exatamente da mesma maneira, em alguns parece que a relação com as águas salinas pode ter sido mais intensa (MENDONÇA DE SOUZA, 1995). Por outro lado os ambientes litorâneos também têm suas diferenças, desde a presença de diferentes tipos de microbiota bacteriana nas águas dos ambientes específicos deve ter variado, tal como atualmente. Assim a exposição aos riscos à saúde representados pelos ambientes costeiros deve ter sido diferente para os diferentes grupos, dependendo de época, de comportamentos culturalmente determinados, da condição ecológica local, etc. Andrade Lima (1991), por exemplo, observa em seu estudo sobre o sambaqui da Ilha do Algodão diferentes explorações de recursos pelos grupos que construíram os diferentes sítios estudados pela autora.

Na revisão de literatura verifica-se que os grupos de sambaquis são os mais bem estudados no Brasil, pela boa preservação dos remanescentes esqueléticos e dentários de milhares de enterramentos humanos já encontrados nestes sítios. Os estudos dentários foram numerosos e integrados com o seu estilo de vida e sua cultura, também relacionado a exposição aos riscos ambientais próprios da região costeira e de uma atividade econômica totalmente voltada para o contato com as águas salinas do mar e de lagunas, onde vibriões seriam abundantes, podendo colonizar tecidos e órgãos humanos pela exposição cotidiana.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a presença de vibriões, pela documentação e interpretação da morfologia dos microfósseis nos cálculos dentários provenientes de esqueletos humanos do sambaqui de Cabeçuda, e propor uma primeira interpretação sobre a constituição dos biofilmes que originaram os cálculos dentários e sua possível relação com a ausência de cáries dentárias naquele grupo pré-histórico.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Testar e desenvolver técnicas de extração e documentação de microfósseis de bactérias presentes em cálculos dentários arqueológicos;
- 2) Descrever os diferentes tipos de morfologias bacterianas presentes nos cálculos dentários;
- 3) Correlacionar os prováveis tipos bacterianos com os descritos na literatura, propondo uma classificação;
- 4) Correlacionar a classificação dos microfósseis com o contexto cultural e ecológico dos povos sambaquieiros estudados;
- 5) Propor um modelo paleoepidemiológico para explicar a ausência de cárie nos indivíduos sepultados no sambaqui de Cabeçuda;

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados nesta pesquisa, dentes provenientes de indivíduos que foram escavados no sambaqui de Cabeçuda entre os anos de 1950 e 1951, pelo pesquisador Luiz de Castro Faria, do Museu Nacional que ficou conhecido, como a primeira escavação científica oficialmente feita em um sambaqui brasileiro (CASTRO FARIA, 1955). O sambaqui de Cabeçuda ($3870 \pm 40\text{AP}^1$, BETA 280004), foi um dos maiores do Brasil, e quando foi escavado, apesar de já se encontrar em parte destruído pela atividade de mineração de conchas para fabricação de calcário, ainda media mais de 20m de altura ocupando cerca de 53.000 m². Este sítio pré-histórico localiza-se entre as lagunas de Santo Antônio dos Anjos e Imaruí, no município de Laguna, estado de Santa Catarina, onde ainda resta parte de suas camadas mais antigas, estudadas por diferentes projetos que vem sendo realizado pelo Museu Nacional/UFRJ e pela Universidade do Sul de Santa Catarina/UNISUL.

A sua estrutura estratigráfica mostra camadas múltiplas e alternada do topo para a base do sítio, que consistem de uma mistura de conchas, ossos, carvão e pequenos blocos de granito (CASTRO FARIA, 1955). Centenas de enterros foram encontrados em Cabeçuda, tendo sido objeto de estudos e publicações (SALLES CUNHA, 1963; MENDONÇA DE SOUZA, 1995; RODRIGUES-CARVALHO, 2003). A principal e mais antiga coleção de esqueletos de Cabeçuda se encontra no Museu Nacional, Rio de Janeiro, sendo constituídos por uma serie antiga e outra mais recente, proveniente das escavações dos últimos 10 anos. Escavações posteriores permitiram a formação de uma nova coleção, a qual se encontra no Museu de Tubarão, Santa Catarina. O material

¹ AP: Antes do presente

estudado na presente dissertação é proveniente do acervo mais antigo do Museu Nacional/UFRJ.

O sítio é formado por conchas limpas de berbigões, por lentes contendo ossos de peixe, principalmente bagres e miraguias (*Tachysuridae* e *Scienidae*), todos provavelmente obtidos na laguna próxima ao sítio. Ossos de aves e de pequenos mamíferos, carvão e pequenos blocos de granito e diabásio eram também encontrados no sítio Vestígios de fogo das antigas fogueiras e também de fogões construídos com pedras, mostrando espessas lentes de carvão, sugeriram, na época, o uso daquele sítio como local habitação (GASPAR, 2004; MENDONÇA DE SOUZA, 1995).

Os estudos do sítio foram feitos nos últimos anos por projetos que revisitam a base, ainda preservada, retornando a escavar e obter novos dados por métodos mais modernos e novas datações, o que deve levar a mudanças nas interpretações futuras sobre o sítio (projetos pertencentes a UFRJ e UNISUL). Entretanto, o presente trabalho estudará apenas o material das escavações pioneiras, já que os materiais atuais podem representar uma etapa diferente de ocupação, de diferente período e com diferente condição de saúde dentária e patocenose (MENDONÇA DE SOUZA, 1995).

Durante a década de 1960, a ausência de cárie foi documentada em 1329 dentes provenientes do sambaqui de Cabeçuda assim como, em outros sambaquis, onde a baixa frequência de cárie também foi descrita. De acordo com Salles Cunha (1963), o baixo índice de cárie seria explicado pela resistência natural dos dentes daqueles povos pré-históricos costeiros à doença.

Alguns anos mais tarde foi discutida a possível relação entre a ausência de cárie e presença universal de bactérias do gênero de *Vibrio*, vibriões de vida livre em água

salinas, tais bactérias colonizam a mucosa da boca dos indivíduos que viveram expostas a água salina, o que provavelmente podem ser encontrados universalmente em superfícies de objetos e seres que viviam em contatos com aquelas águas, cujo estilo de vida nos sambaquis, os expusessem a esta ecologia peculiar, tal como argumenta Mendonça de Souza (1995): “A existência de patógenos , cuja especificidade pode ser atribuída a esse tipo de ambiente e estilo de vida , atenderia melhor à necessidade de formulação de um modelo explicativo para o observado, e essa condição é dada pela patogenicidade dos vibriões de águas salinas, presentes universalmente. Micro-organismos desse tipo, tais como o *Vibrio parahaemolyticus*, estariam presentes amplamente no ambiente em que viveram os grupos sambaquieiros, causando além de gastroenterites severas, otites, infecções cutâneas ulceradas e até septicemias letais. A presença desses patógenos, no cotidiano dos sambaquis, certamente poderia explicar o desenho patocenótico encontrado e representar o fator de estresse mais significativo para esses grupos”.

O material está listado no Livro de Tombo do Setor de Antropologia Biológica do Museu Nacional da Quinta da Boa Vista. Ali foi possível confirmar a distribuição estratigráfica dos achados, com base nos registros dos esqueletos feito durante a escavação. Esta listagem confirma que os sepultamentos foram encontrados em praticamente todos os níveis escavados (MENDONÇA DE SOUZA, 1995). De acordo com Castro Faria (1955), existe uma diferença na concentração dos sepultamentos o que correspondem a uma transição na ocupação humana deste sítio, a qual implicou em práticas culturais diferentes.



Figura 1: vista do sambaqui de Cabeçuda com setas indicando o local de escavação realizada em 1950/1951 (CASTRO FARIA, 1955).

A coleção de esqueletos humanos que constitui o acervo do sambaqui de Cabeçuda foi estimada em um mínimo de 162 indivíduos adultos e 83 jovens e crianças, em diferentes condições de preservação (MENDONÇA DE SOUZA, 1991). Do total de esqueletos, no acervo do Museu Nacional existem 73 números de tombo com dentes, uns contendo crânio e mandíbula vinculados e outros contendo dentes avulsos.

Os critérios de inclusão dos indivíduos para amostras para o estudo foram: 1) a presença de cálculos dentários de tamanho mínimo (pelo menos 0,0010g) e localização que permitissem a remoção para o estudo; 2) dentes permanentes; 3) a procedência confirmada do material pelo registro no Livro de Tombo;

Foram selecionados 19 diferentes dentes permanentes, 13 dentes não articulados e 6 dentes articulados. Como a perda de dentes incisivos é maior em vida

(RODRIGUES-CARVALHO; MENDONÇA DE SOUZA, 2003.), foi acordado que para esta pesquisa fossem escolhidos preferencialmente os dentes molares, pois sofrem menos perda em vida nesta série pré-histórica e também apresentam maior volume de cálculos, pela proximidade dos dutos de glândulas salivares.

Inicialmente foram lidos os arquivos do Livro de Tombo, onde a coleção escolhida para estudo está registrada. Tratando-se de uma grande coleção e sendo o tempo disponível para estudo curto foi proposta a utilização de um conjunto reduzido para esta tentativa pioneira da documentação de bactérias em cálculos dentários do Brasil.

Após exame dos exemplares da coleção pré-selecionados, e à vista desarmada, foram escolhidos os dentes seguindo tais procedimentos: 1) documentação e registro dos exemplares 2) exame e higienização do cálculo “in situ”; 3) remoção do cálculo dentário; 4) exposição dos microfósseis; 5) microscopia eletrônica de varredura; 6) característica e identificação dos microfósseis e sua interpretação;

A dificuldade de acesso aos materiais e o caráter experimental da metodologia justificaram a escolha preferencial para o presente estudo de dentes já avulsionados, o que causaria menor impacto sobre a coleção. Para esta decisão levamos em conta o caráter destrutivo da análise, uma vez que os cálculos seriam retirados e desagregados, não retornando ao museu.

FASE 1 – DOCUMENTAÇÃO E REGISTRO DOS EXEMPLARES

Após a seleção dos exemplares, cujos dentes estavam ou não articulados, os mesmos foram detalhadamente documentados por meio de fichas descritivas (apêndice), onde constaram as informações referentes ao exemplar e ao dente. Para este fim foram

elaboradas fichas para o registro gráfico dos cálculos, indicando inclusive a área do qual haviam sido removidas. Nestas fichas foram também incluídas as informações que permitiam identificar exemplares, sua localização arqueológica e quando articulado, informação sobre o crânio e a mandíbula. Foram também registradas características da superfície dos dentes utilizados no estudo, e dos cálculos antes e depois da higienização. Finalmente foram registradas as referências para controle das fotografias obtidas em arquivo digital apropriado.

Os dentes escolhidos para a retirada de amostras de cálculos foram identificados e descritos. O exame de todos os exemplares foi feito em condição de iluminação artificial semelhante, respeitando períodos de observação com intervalos de descanso para reduzir o erro intra-observador. Foram fotografados com a câmera digital Nikon D90 18-105mm. Foi feito a documentação do conjunto ósseo (crânio/mandíbula) quando existente antes da remoção do dente e do cálculo, para cada indivíduo analisado.

FASE 2 – EXAME E HIGIENIZAÇÃO DO CÁLCULO “IN SITU”

O cálculo foi examinado, documentado e descrito antes de ser removido, tanto no dente articulado, como no dente avulsionado. Fotografias obtidas com lupa digital Avantgarde® com aumento de 50x foram usadas para caracterização da superfície externa do cálculo e o do dente.

A superfície do dente e do cálculo a ser removido foi higienizado com auxílio de escova interdental Colgate®, sendo aplicada apenas água destilada para remoção de resíduos de solo, cinzas e carvão aderidos. O procedimento foi cuidado para não haver desprendimento do cálculo dentário.

O exame da superfície, com lupa e à vista desarmada foi repetido após higienização da superfície dos cálculos, e antes de sua remoção.

FASE 3 – REMOÇÃO DO CÁLCULO

Foram removidos da mesma forma os cálculos dos dentes articulados e avulsionados. A remoção do cálculo foi feita sem sua retirada do alvéolo, preservando a peça, como o preconizado por Wesolowski (2007), com auxílio de uma cureta odontológica, sendo o cálculo desprendido com ligeira pressão na base do cálculo entre a raiz e a coroa do dente, tendo o dente ou a arcada dentária sob uma placa de petri.

Uma vez removidos os cálculos, ou fragmentos recolhidos na placa de petri, foram novamente examinados, sendo identificada a superfície que se encontrava em contato com o esmalte dentário. Esta superfície também foi fotografada com a lupa digital, não havendo necessidade de higienizá-lo. O cálculo foi então pesado em balança digital SPLABOR e guardado em Eppendorf de 2ml, contendo informações do material que será preservado para análise.

O fragmento de cálculo de cada indivíduo foi particionada, tendo em vista seu uso para outros estudos em andamento, ou a revisão do presente estudo.

FASE 4 – EXPOSIÇÃO DOS MICROFÓSSEIS

A primeira técnica testada para liberação dos microfósseis para exame foi baseada na desagregação mecânica por meio do ultrassom. Esta técnica foi proposta baseada em outros experimentos do laboratório de Paleoparasitologia e visava liberar

sem uso de dissolução química os menores componentes do cálculo, que possuía microfósseis de bactérias. Uma vez desagregado e liberado em meio aquoso, os microresíduos e fósseis poderiam ser concentrados sobre superfície padronizada e depois levados ao microscópio de varredura (MEV), sendo visualizados, descritos e documentados. Os primeiros testes realizados, no entanto, mostraram ser os cálculos dentários de Cabeçuda de muito difícil desagregação, principalmente por serem mineralizados e muito resistentes a este processo físico.

A dissolução do cálculo, tal como realizado por estudo de outros tipos de microfósseis, como resto vegetais (Wesolowski, 2007), não pode ser empregado neste caso porque ao contrário daqueles, os microfósseis bacterianos estão mineralizados sendo desfeitos quando expostos ao ácido.

Diante da impossibilidade de desagregar os cálculos por ultrassom, foi reutilizada uma técnica alternativa, sendo os cálculo fragmentados e as superfícies de fratura examinadas diretamente após montados nos “*stubs*” apropriados.

Apesar da limitação decorrente desta abordagem, ela permitiu uma pioneira documentação de molde e microfósseis em diferentes superfícies dos cálculos examinados.

FASE 5 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os fragmentos desagregados de cálculo dentário foram montados sobre fita de carbono (Ted Pella Inc) e preso aos *stubs*, sendo em seguida mineralizados, ou seja, revestidas com ouro. As preparações foram então levadas aos microscópios eletrônicos de varredura Quanta 250 (FEI company) e Zeiss EVO MA10 operado a alto vácuo

(10kv). Foram utilizados dois microscópios eletrônicos diferentes no período de realização do trabalho, pois houve complicações com microscópio Zeiss EVO MA10, o qual foi originalmente utilizado para a pesquisa, passando desta maneira a ser utilizado o microscópio Quanta 250 (FEI company). Em ambos os microscópios foram realizadas imagens com magnitudes diferenciadas, pois cada material necessitava um aumento diferente para que fosse melhor visualizado. O trabalho foi realizado no Laboratório de Ultraestrutura Celular Herta Mayer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, que mantém cooperação com o Laboratório de Paleoparasitologia da ENSP. A preparação e as fotografias foram realizadas pela técnica Rachel Rachid da equipe do Dr. Wanderley Souza, sendo acompanhada pela autora.

FASE 6 – CARACTERÍSTICA E IDENTIFICAÇÃO DOS MICROFÓSSEIS E SUA INTERPRETAÇÃO

Os microfósseis bacterianos foram caracterizados nas imagens, levando em conta as medidas padrão de largura/comprimento para bastonetes, e diâmetro máximo para cocos, passando a ser comparados com a morfologia das bactérias modernas, seguindo a referência de literatura proposta por Bergey (1975) e por Zhou e Li, (2015).

Os tipos de morfologias identificadas permitiram discutir a possível presença de vibriões e outras bactérias nos cálculos examinados. Os resultados foram correlacionados com a literatura atual em relação aos achados em cálculos dentários, sobre a microbiota de placas e biofilmes da cavidade oral, e também eram levados em conta trabalhos publicados sobre patologia dentária.

As cavidades microbianas e microfósseis bacterianos, em cada exemplar, foram contabilizados da seguinte maneira: foi selecionada a foto de microscopia eletrônica de varredura, que melhor representasse o cálculo dentário. Esta foi dividida em quatro quadrantes e cada quadrante foi contabilizado pelo menos 3 vezes, em períodos espaçados, para minimizar o viés intra-observador e em seguida, somada as contagens e realizada a média das mesmas. As cavidades foram identificadas apenas quando a quebra era longitudinal permitindo confirmar que se tratava de bastonetes.

Foi realizada a planimetria das imagens, com a finalidade de obter a densidade de bactérias existentes por μm^2 . A técnica se baseou principalmente em calcular a área total da imagem, utilizando a unidade de medida relatada nas fotos (μm), algumas imagens tiveram partes excluídas no momento do cálculo da área, pois estes correspondiam a frações que não havia fragmentos de cálculo dentário. Após obter a área total de cada imagem, estes números foram utilizados como denominadores para calcular o total de bactérias em cada superfície fotografada. Como numerador, foi utilizada a soma total das cavidades e bactérias existentes, conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Densidade} = \frac{\text{nº de microfósseis de bactérias+cavidades}}{\text{área total da imagem } (\mu\text{m}^2)}$$

O resultado foi discutido à luz de modelos atuais sobre a formação dos cálculos, a cariogênese e à luz do contexto conhecido para o grupo pré-histórico.

5. RESULTADOS

O total de exemplares analisados foi de 13 dentes não articulados e 6 dentes provenientes de crânio e/ou mandíbula ainda preservado. Os exemplares estudados apresentaram sua posição no sítio arqueológico, variando de 1,50m-1,75m a 6,00m-6,25m, sendo provenientes de diferentes quadras. As diferentes profundidades indicam que os esqueletos haviam sido sepultados em dois diferentes conjuntos de uso do cemitério, mas em ambos se observa a ausência de cárie, indicando que ambos provavelmente estiveram sob a mesma condição paleoepidemiológica.

Na totalidade do estudo, foram utilizados preferencialmente dentes molares, pois com a exceção de um exemplar, cujo dente onde havia maior formação do cálculo dentário, era o canino. Os dados que caracterizam os exemplares estudados podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1: Identificação, localização espacial e estratigráfica, e características dos dentes escolhidos e peso dos cálculos humanos estudados para o sambaqui de Cabeçuda.

Número do exemplar	Quadra	Nível estratigráfico	Avulso sim/não	Tipo de dente	Peso do cálculo
1673	II B(A)	2,50m– 2,75m	Não	Molar Inferior Esquerdo	0,0020g
1674	II B(C)	2,50m-2,75m	Não	Molar Inferior Esquerdo	0,0030g
1675	II-A	2,00m-2,25m	Sim	Molar Inferior Esquerdo	0,0050g
1691	III-F	4,00m-4,25m	Sim	Molar Superior Direito	0,0033g
1701	IV-D	2,25m-2,50m	Não	Canino Superior Esquerdo	0,0028g
1729	V-A	1,50m-1,75m	Não	Molar Inferior Direito	0,0018g
1738	VII-A	2,25m-2,50m	Não	Molar Inferior Esquerdo	0,0029g
1743	IV-F	4,00m-4,75m	Sim	Molar Superior Direito	0,0024g
1744	V-VII-VIII	2,50m-2,75m	Sim	Molar Superior Direito	0,0031g
1753	S/I	S/I	Sim	Molar Superior Direito	0,0019g
1771	VI-F	5,20m	Sim	Molar Superior Direito	0,0010g
1778	VII-H	6,00m-6,25m	Sim	Molar Superior Direito	0,0016g
1793	S/I	S/I	Sim	Molar Superior Direito	0,0012g
1796	S/I	S/I	Sim	Molar Superior Esquerdo	0,0016g
1916	S/I	S/I	Sim	Molar Superior Direito	0,0021g
1918	S/I	S/I	Sim	Molar Inferior Direito	0,0041g
1920	VII-G	6,00m-6,25m	Sim	Molar Inferior Direito	0,0016g
1924	B	2,00m-2,75m	Sim	Molar Superior Esquerdo	0,0023g
1942	S/I	S/I	Sim	Molar Inferior Esquerdo	0,0028g

Legenda: S/I – Sem Indicação

A microscopia eletrônica de varredura (MEV), confirmou que além dos microfósseis bacterianos era possível observar as cavidades deixadas pelos corpos bacterianos que originalmente formavam a placa. Os microfósseis permitiram o registro morfológico, que por sua vez foram analisados para forma e tamanho, tendo em vista a classificação das bactérias.

A quantidade de microfósseis por imagem variou de 48 a 300, pois as mesmas se encontram em diferentes magnificações. Para melhor visualização dos microfósseis no presente trabalho, os mesmos foram coloridos pelo programa Adobe Photoshop CC 2014.2.2 (Fig. 2B; Fig. 3B; Fig. 4B; Fig. 5B; Fig. 6B; Fig. 7B; Fig. 8B; Fig. 9B; Fig. 10B; Fig. 11B; Fig. 12B; Fig. 13B; Fig. 14B; Fig. 15B; Fig. 16B; Fig. 17B; Fig. 18B; Fig. 19B; Fig. 20B). As cavidades que representam a moldagem dos corpos bacterianos pela matriz mineralizada do cálculo, foram contabilizadas e houve a variação foi de 32 a 190 cavidades. Não foi possível identificar a que tipo bactérias as cavidades deixadas pertenciam, pois o ângulo o qual se encontravam, poderia não corresponder corretamente.

A densidade de bactérias estimada para cada superfície de cálculo dentário analisada variou de 0,056 bactérias por μm^2 a 0,83 bactérias por μm^2 (gráfico 1). Estes resultados se encontram sumarizados na tabela 2.

Tabela 2: Tipo de equipamento utilizado no estudo dos cálculos dentários humanos do sambaqui de Cabeçuda, quantidade de fotos obtidas e total de microfósseis e cavidades em cada imagem de cada exemplar.

Número do exemplar	Tipo de microscópio empregado	Magnificação	Quantidade de fotos obtidas	Total de microfósseis na imagem analisada	Total de cavidades na imagem analisada	Densidade de microfósseis por μm^2
1673	Quanta 250	8.000x	4	132	210	0,32
1674	Quanta 250	1.600x	4	85	60	0,0049?
1675	Zeiss EVO MA10	5.250x	6	57	116	0,11
1691	Zeiss EVO MA10	7.050x	4	86	63	0,10
1701	Quanta 250	20.000x	4	60	32	0,47
1729	Quanta 250	9.752x	4	138	70	0,26
1738	Quanta 250	6.000x	4	153	120	0,13
1743	Zeiss EVO MA10		8	84	190	0,83
1744	Quanta 250	6.000x	4	158	110	0,13
1753	Zeiss EVO MA10	16.560x	4	65	138	0,82
1771	Zeiss EVO MA10	12.110x	4	48	100	0,38
1778	Zeiss EVO MA10	9.490x	8	109	135	0,38
1793	Quanta 250	10.000x	8	149	45	0,24
1796	Zeiss EVO MA10	9.430x	7	70	180	0,43
1916	Zeiss EVO MA10	6.490x	4	360	165	0,36
1918	Zeiss EVO MA10	13.210x	4	58	60	0,30
1920	Zeiss EVO MA10	9.250x	7	80	68	0,19
1924	Zeiss EVO MA10	10.480x	4	85	60	0,37
1942	Zeiss EVO MA10	5.000x	4	80	70	0,056

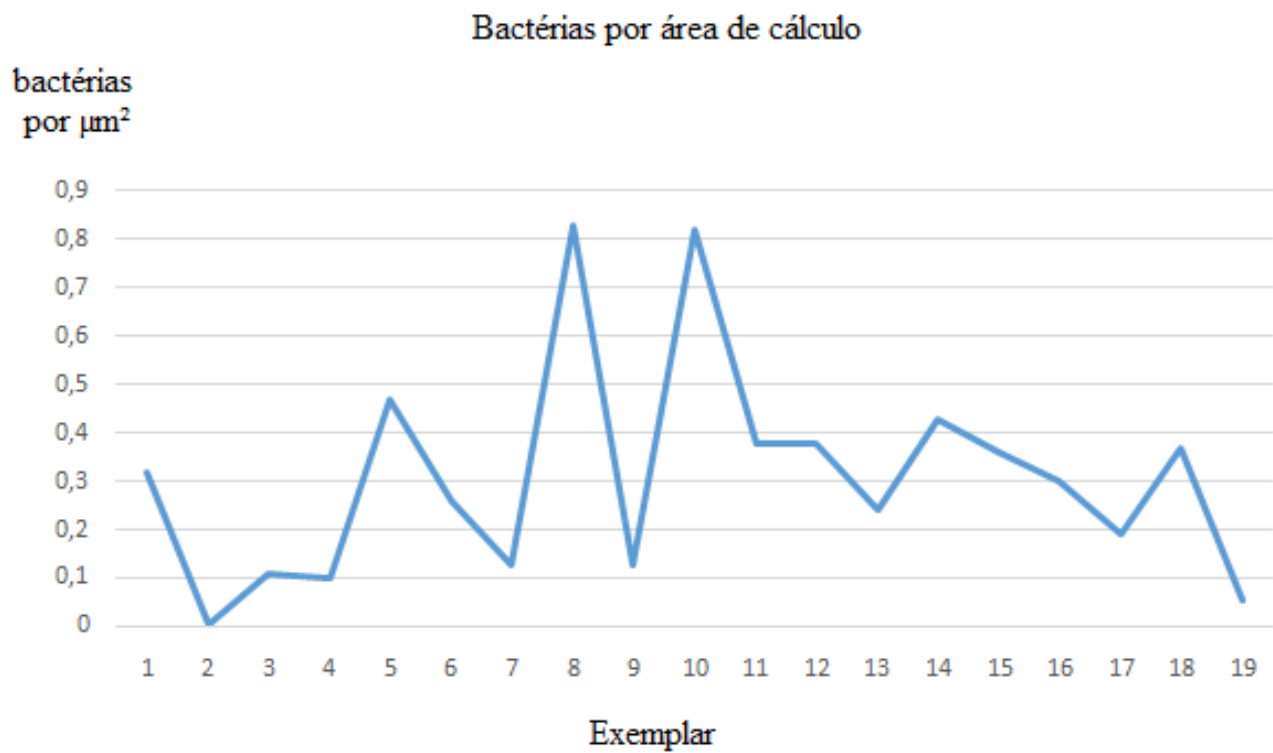


Gráfico 1: Densidade de bactérias por μm^2 de superfície nos cálculos dentários estudados.

A técnica utilizada (MEV) permitiu imagens tridimensionais de alta resolução. A visualização de apenas uma superfície dificultou a identificação presuntiva dos gêneros bacterianos possivelmente presentes neste nicho ecológico. Todavia foi possível excluir, por meio da visualização, alguns gêneros morfológicamente distintos daqueles observados. As fotografias foram obtidas em diferentes magnificações, devido à dificuldade de visualização das estruturas presentes em alguns cálculos dentários, logo, alguns exemplares necessitaram de maiores aumentos.

A classificação dos microfósseis de acordo com suas dimensões e características morfológicas, resultou nos seguintes tipos: “Tipo A”, “Tipo B”, “Tipo C”, “Tipo D” e “Tipo E”. A partir dos tipos gerados, estes foram correlacionados com as bactérias descritas na literatura como pertencentes à microbiota dos cálculos dentários humanos atuais, o que permitiu propor os prováveis micro-organismos presentes nas imagens. Estes resultados podem ser visualizados na tabela 3.

Tabela 3: Classificação dos microfósseis dos cálculos dentários humanos provenientes do sambaqui de Cabeçuda, suas respectivas dimensões e características e as bactérias provavelmente representadas por cada tipo, a partir da correlação com a literatura.

Tipo de Microfóssil	Variação das dimensões	Características	Prováveis bactérias
“Tipo A” Provável bastonete	0,5µm a 0,8µm de largura 1,0µm a 3,5µm de comprimento	Corpos bacterianos retos, em forma de vareta, se apresentam em cadeias ou individualmente.	<i>Lactobacillus</i> spp.; <i>Porphyromonass</i> spp.; <i>Actinomyces</i> spp.
“Tipo B” Provável bastonete	0,6 µm a 0,8µm de largura 1,3µm a 3,8µm de comprimento	Corpos bacterianos curvados, que se apresentam em cadeias ou individualmente.	<i>Lactobacillus</i> spp.; <i>Lepotrichia</i> spp.
“Tipo C” Provável coco	0,5µm a 1,3µm de diâmetro	Corpos bacterianos esféricos, ocorrendo isoladamente.	<i>Rothia</i> spp.; <i>Neisseria</i> spp.; <i>Staphylococcus</i> spp.
“Tipo D” Provável coco	0,5µm a 0,8µm de diâmetro	Corpos bacterianos esféricos, ocorrendo em formação de cadeias	<i>Rothia</i> spp.; <i>Neisseria</i> spp.; <i>Veillonella</i> spp.; <i>Peptrostreptococcus</i> spp.; <i>Streptococcus</i> spp.
“Tipo E” Provável coco	0,5µm a 0,8µm de diâmetro	Corpos bacterianos esféricos, ocorrendo em pares ou tétrades.	<i>Rothia</i> spp.; <i>Neisseria</i> spp.; <i>Staphylococcus</i> spp.

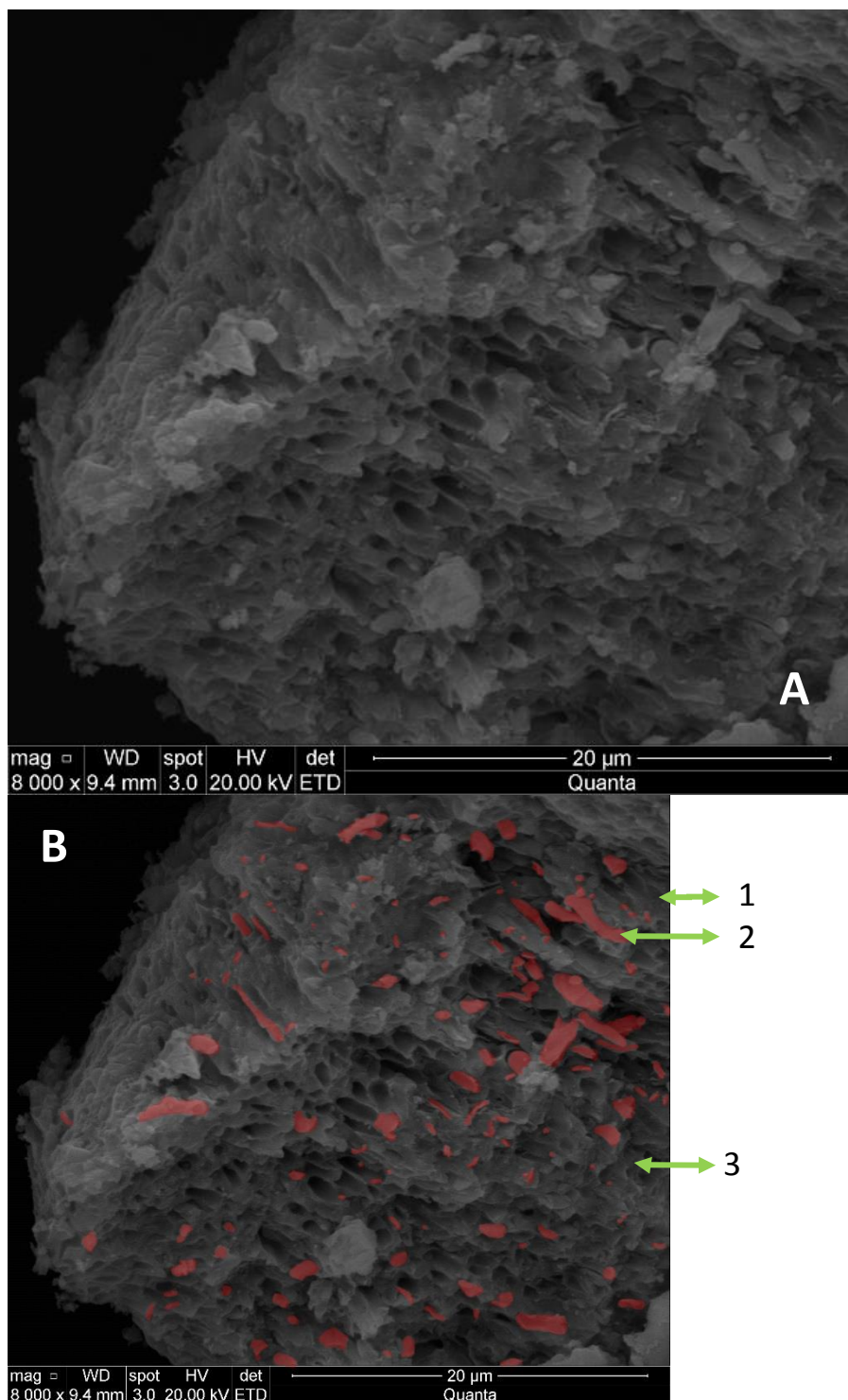


Figura 2 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1673, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.²

² Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; (3) Área interna com microfósseis e cavidades visíveis;

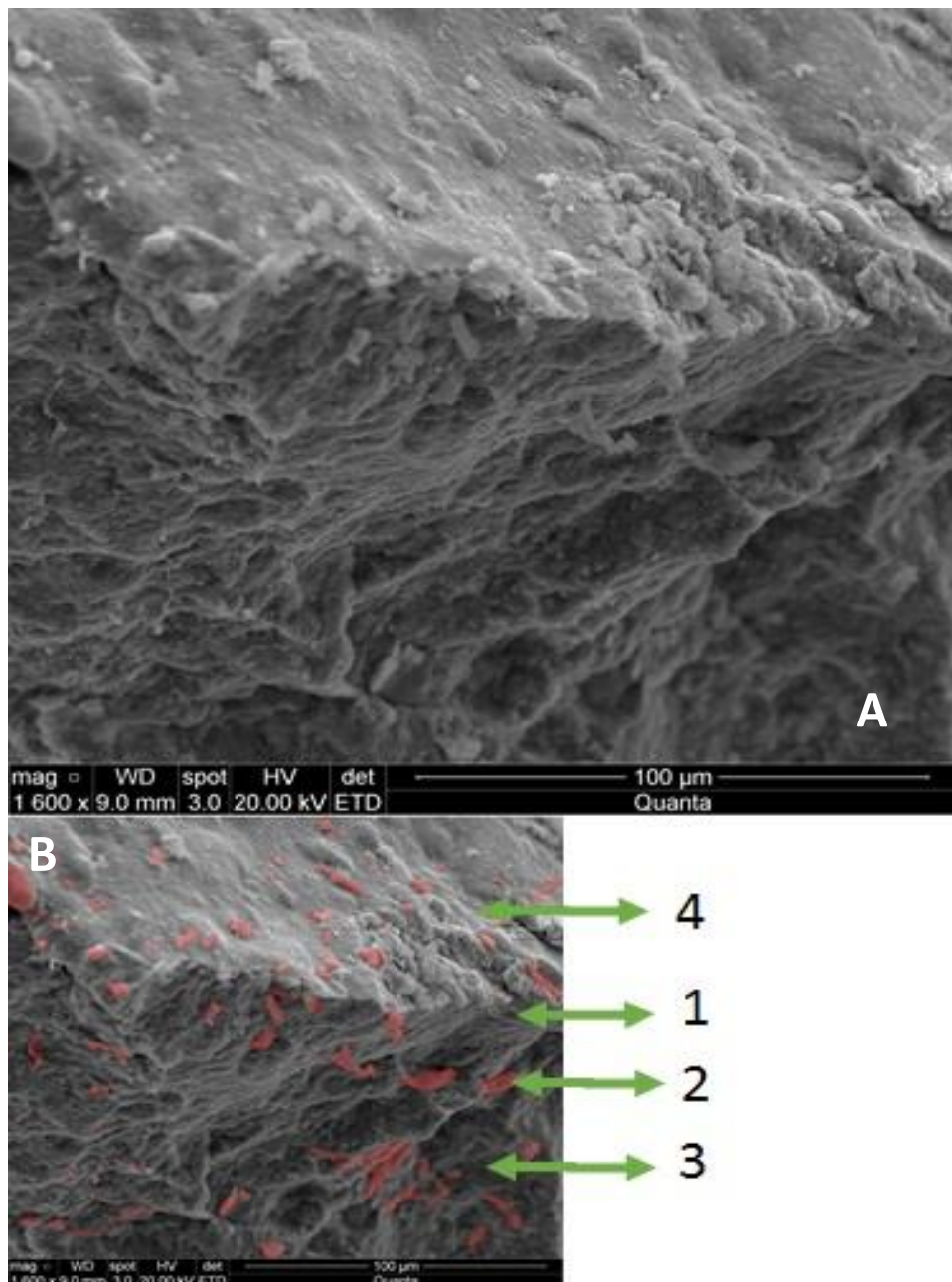


Figura 3 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1674, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.³

³ Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; (3) Área interna com microfósseis e cavidades visíveis; (4) Área de superfície externa do cálculo preservada, homogênea, formada por material calcificado (matriz);

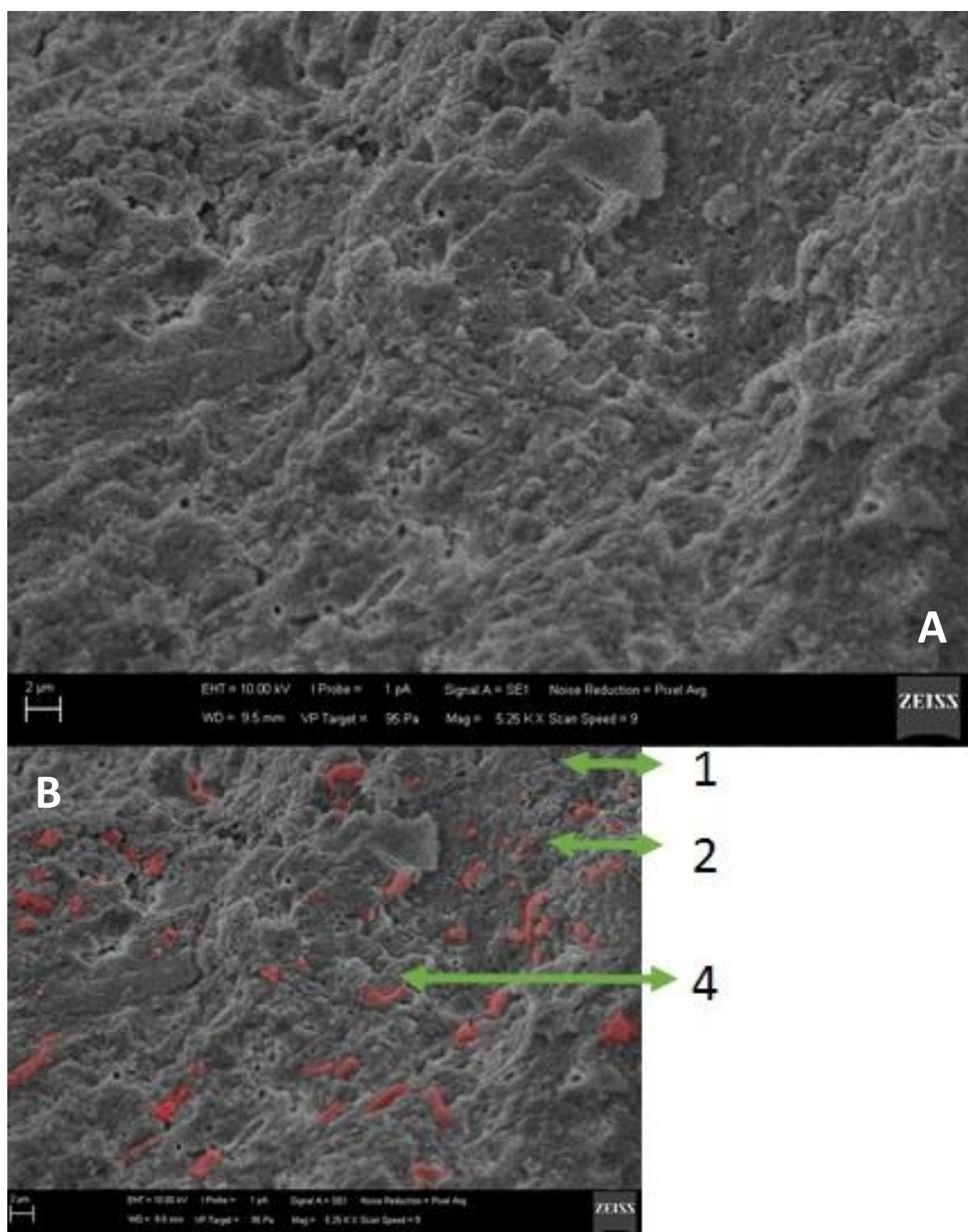


Figura 4 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1675, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.⁴

⁴ Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; (4) Área de superfície externa do cálculo preservada, homogênea, formada por material calcificado (matriz);

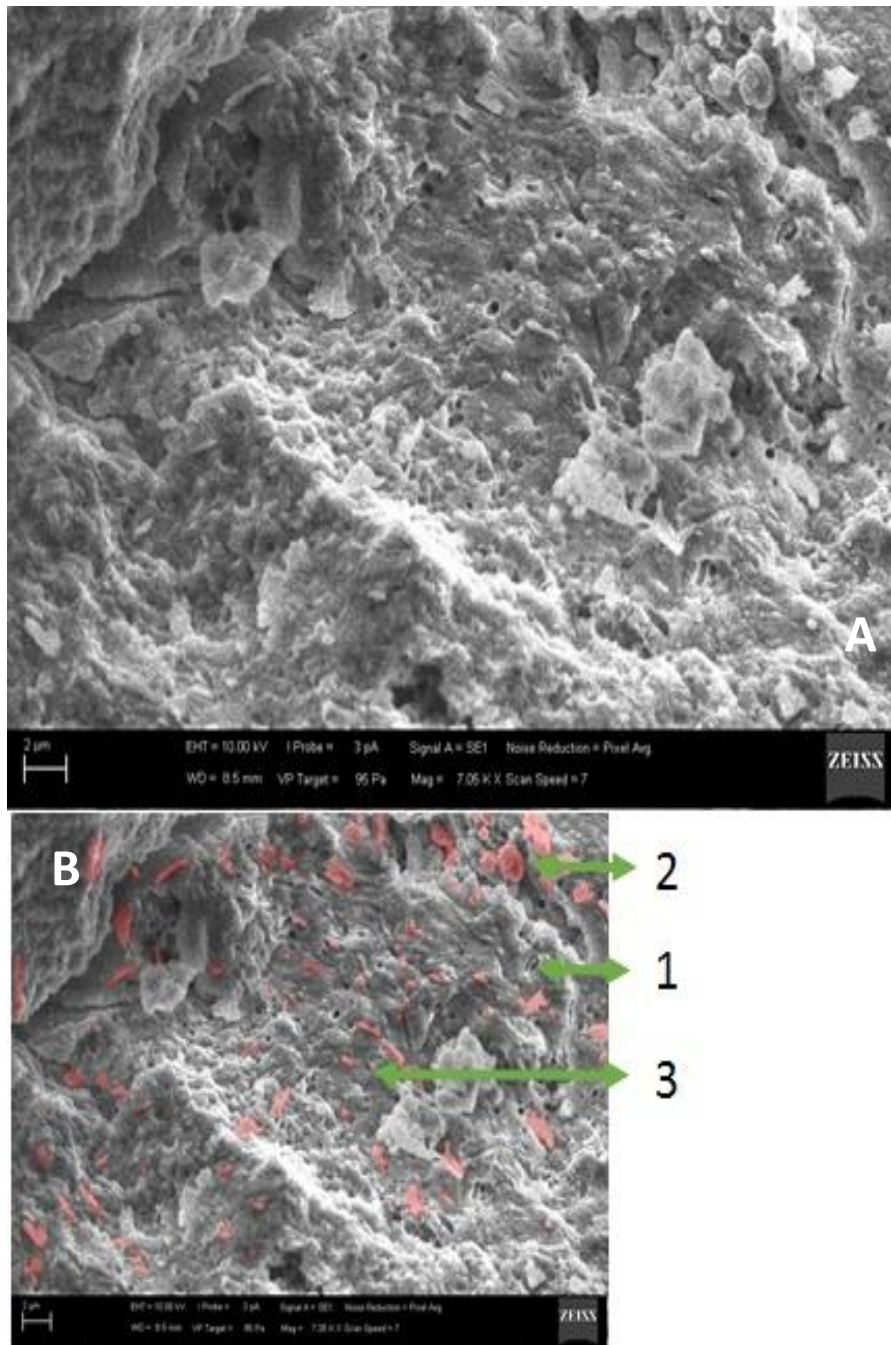


Figura 5 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1691, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.⁵

6

⁵ Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; (3) Área interna com microfósseis e cavidades visíveis;

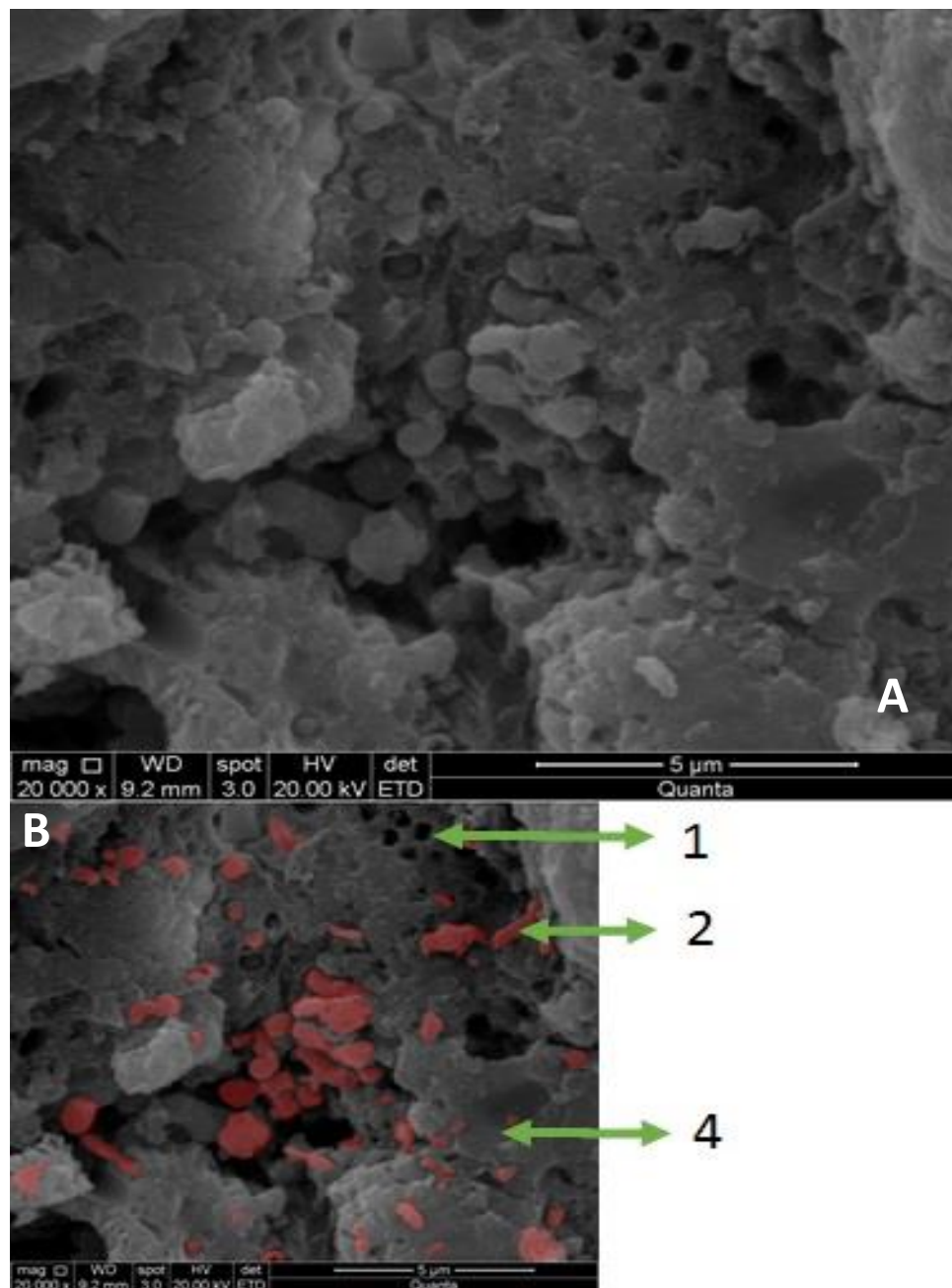


Figura 6 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1701, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.⁷

⁷ Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; 4) Área de superfície externa do cálculo preservada, homogênea, formada por material calcificado (matriz);

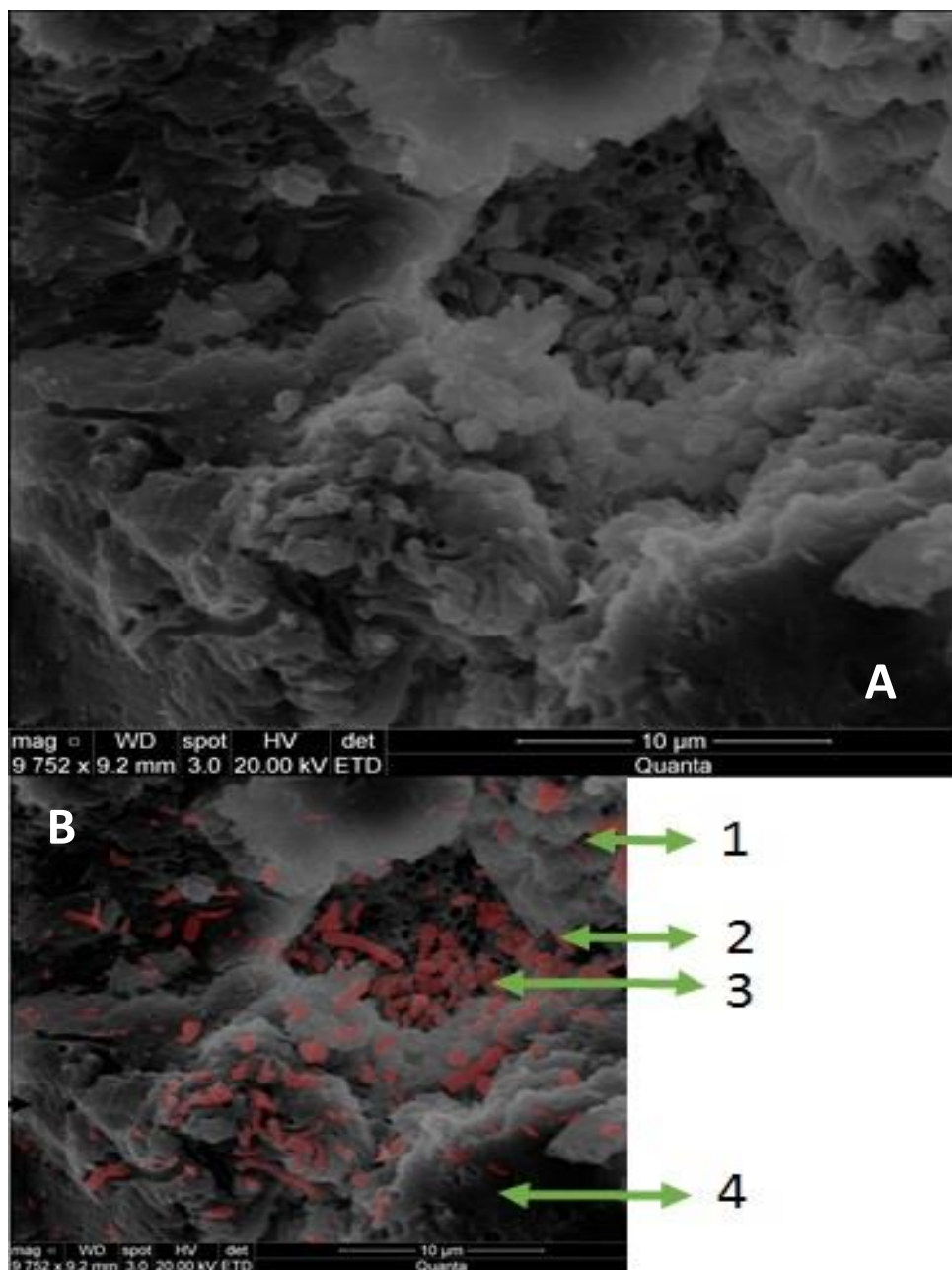


Figura 7 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1729, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.⁸

⁸ Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; (3) Área interna com microfósseis e cavidades visíveis; (4) Área de superfície externa do cálculo preservada, homogênea, formada por material calcificado (matriz);

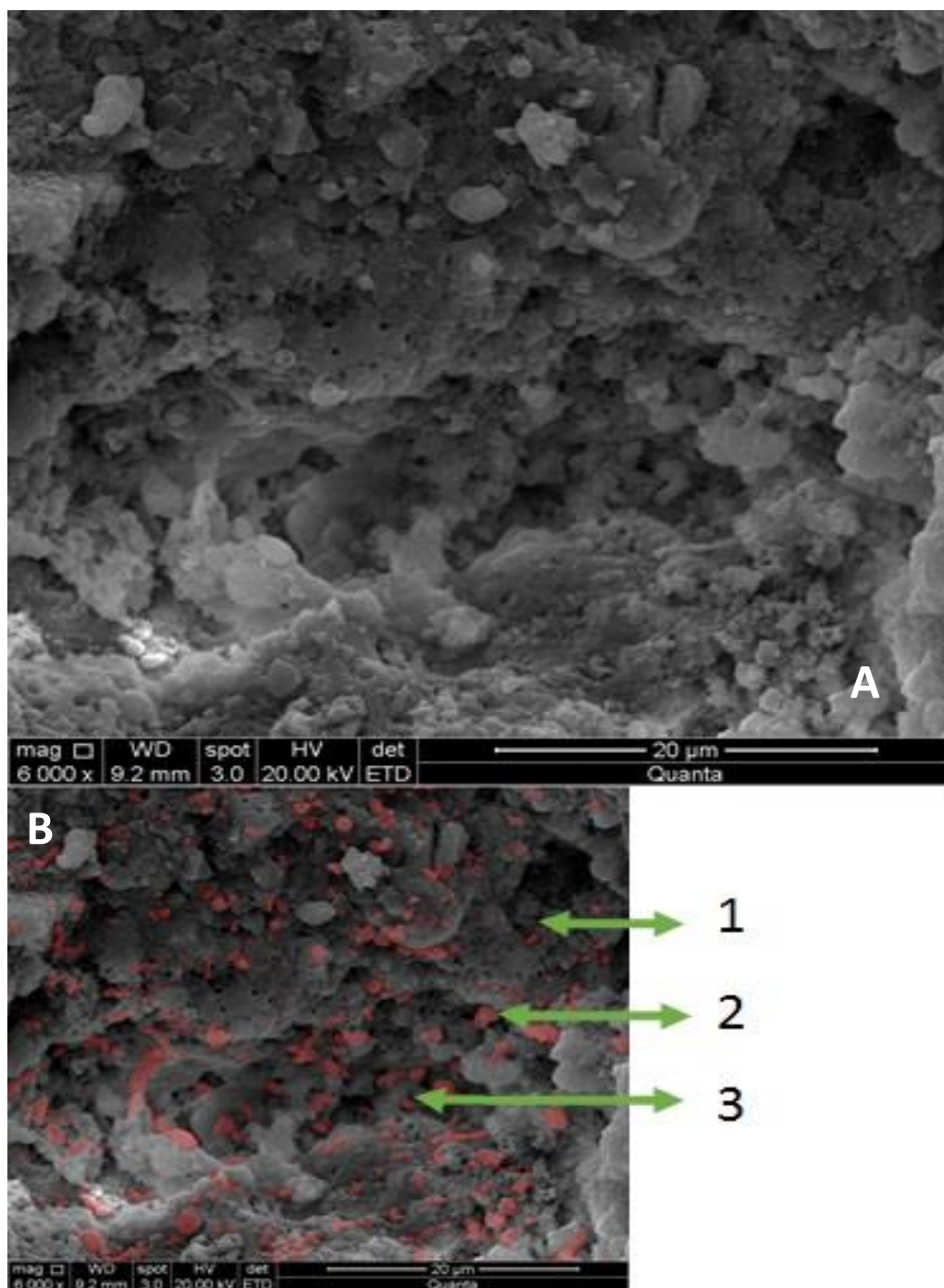


Figura 8 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1738, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.⁹

⁹ Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; (3) Área interna com microfósseis e cavidades visíveis;

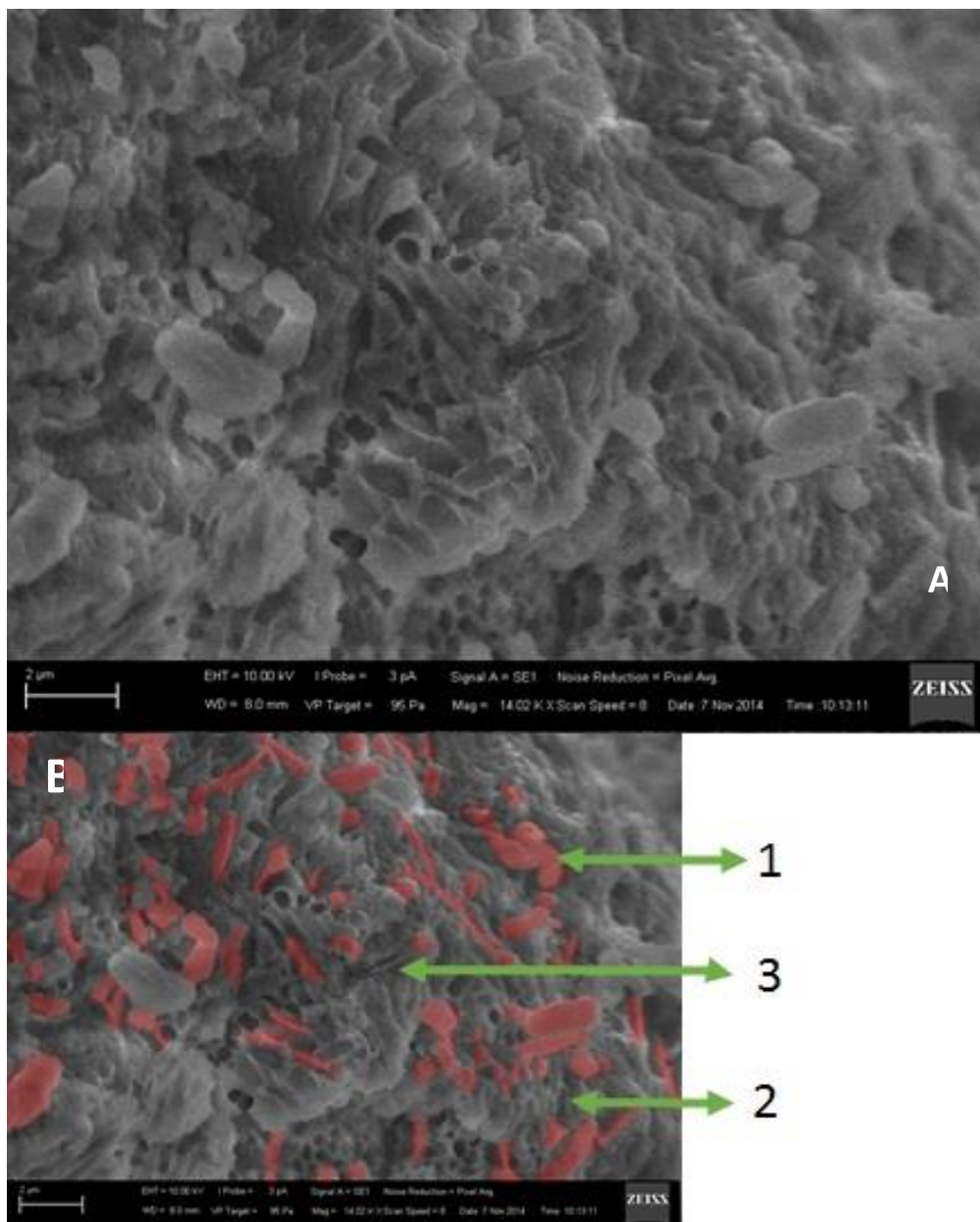


Figura 9 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1743, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.¹⁰

¹⁰ Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; (3) Área interna com microfósseis e cavidades visíveis;

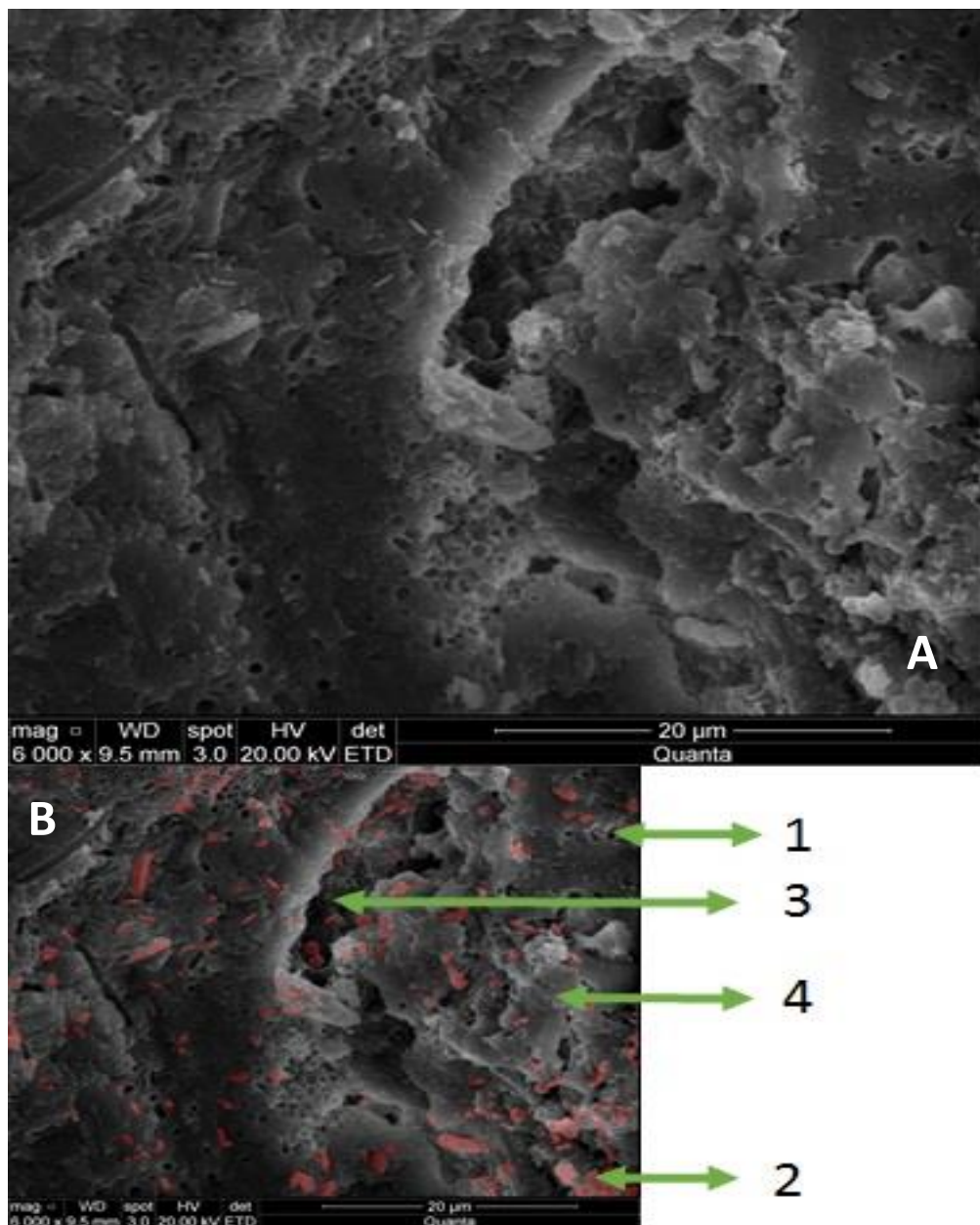


Figura 10 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1744, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.¹¹

¹¹ Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; (3) Área interna com microfósseis e cavidades visíveis; (4) Área de superfície externa do cálculo preservada, homogênea, formada por material calcificado (matriz);

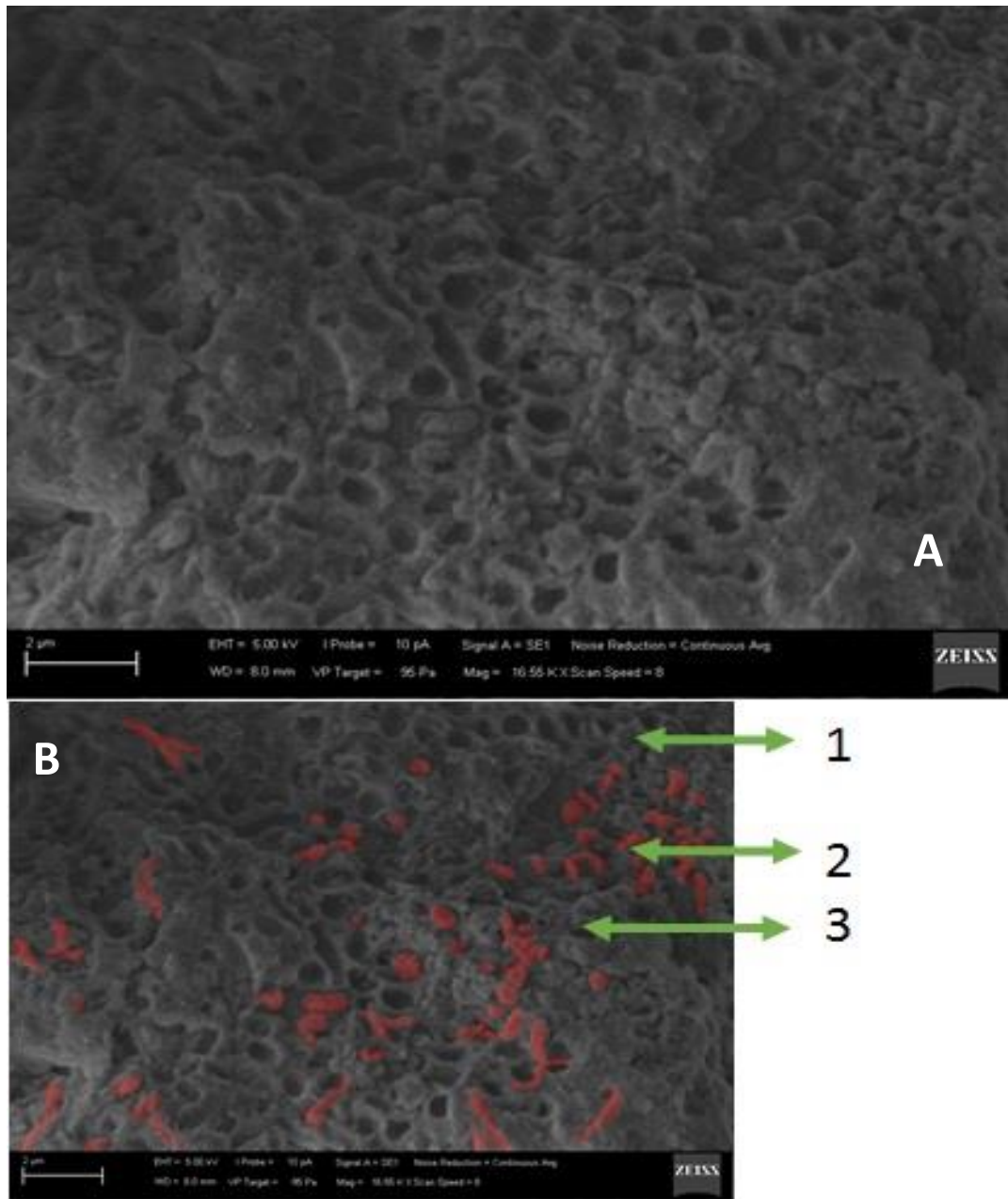


Figura 11 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1753, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.¹²

¹² Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; (3) Área interna com microfósseis e cavidades visíveis;

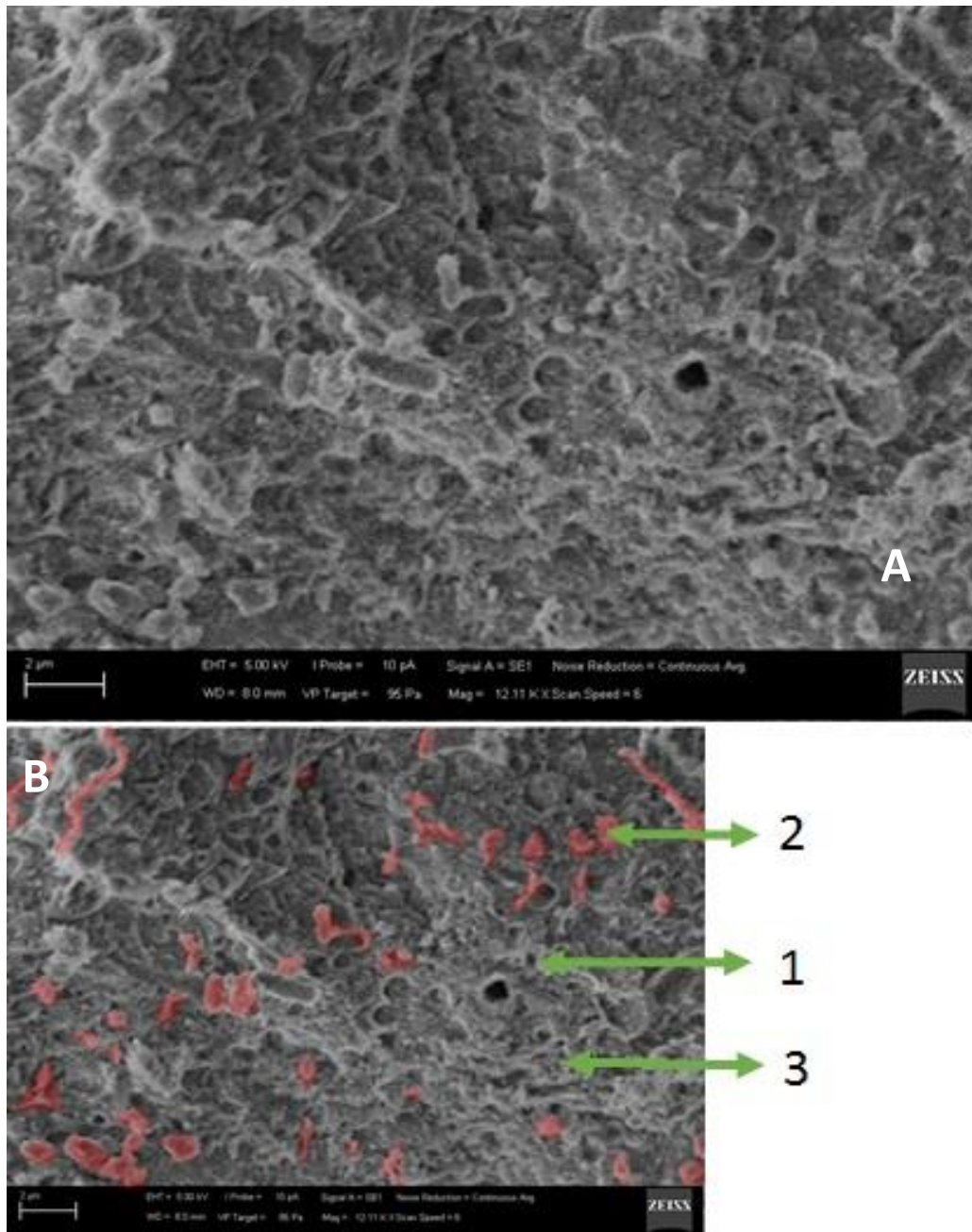


Figura 12 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1771, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.¹³

¹³ Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; (3) Área interna com microfósseis e cavidades visíveis;

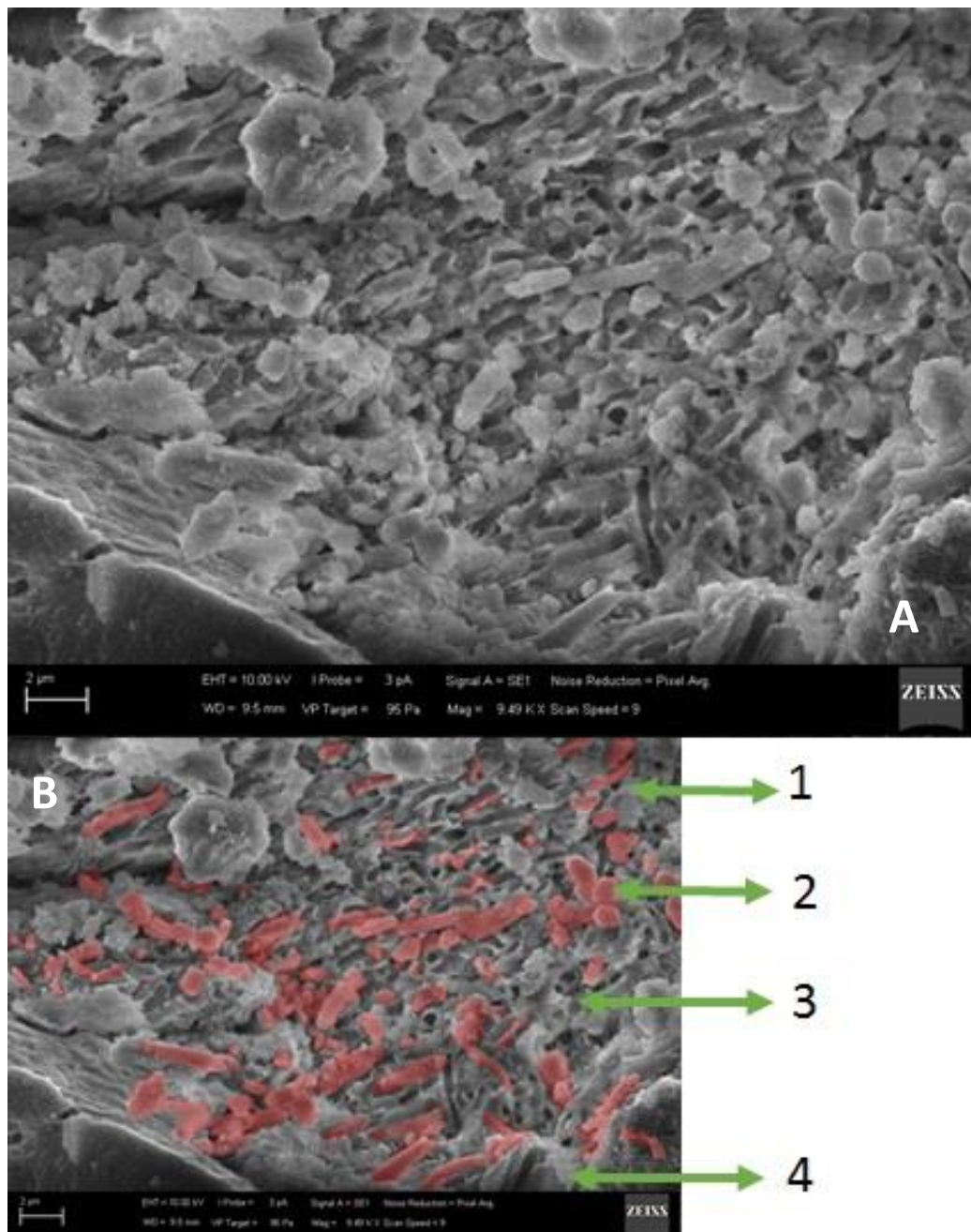


Figura 13 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1778, sambaqui de Cabeçada, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.¹⁴

¹⁴ Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; (3) Área interna com microfósseis e cavidades visíveis; (4) Área de superfície externa do cálculo preservada, homogênea, formada por material calcificado (matriz);

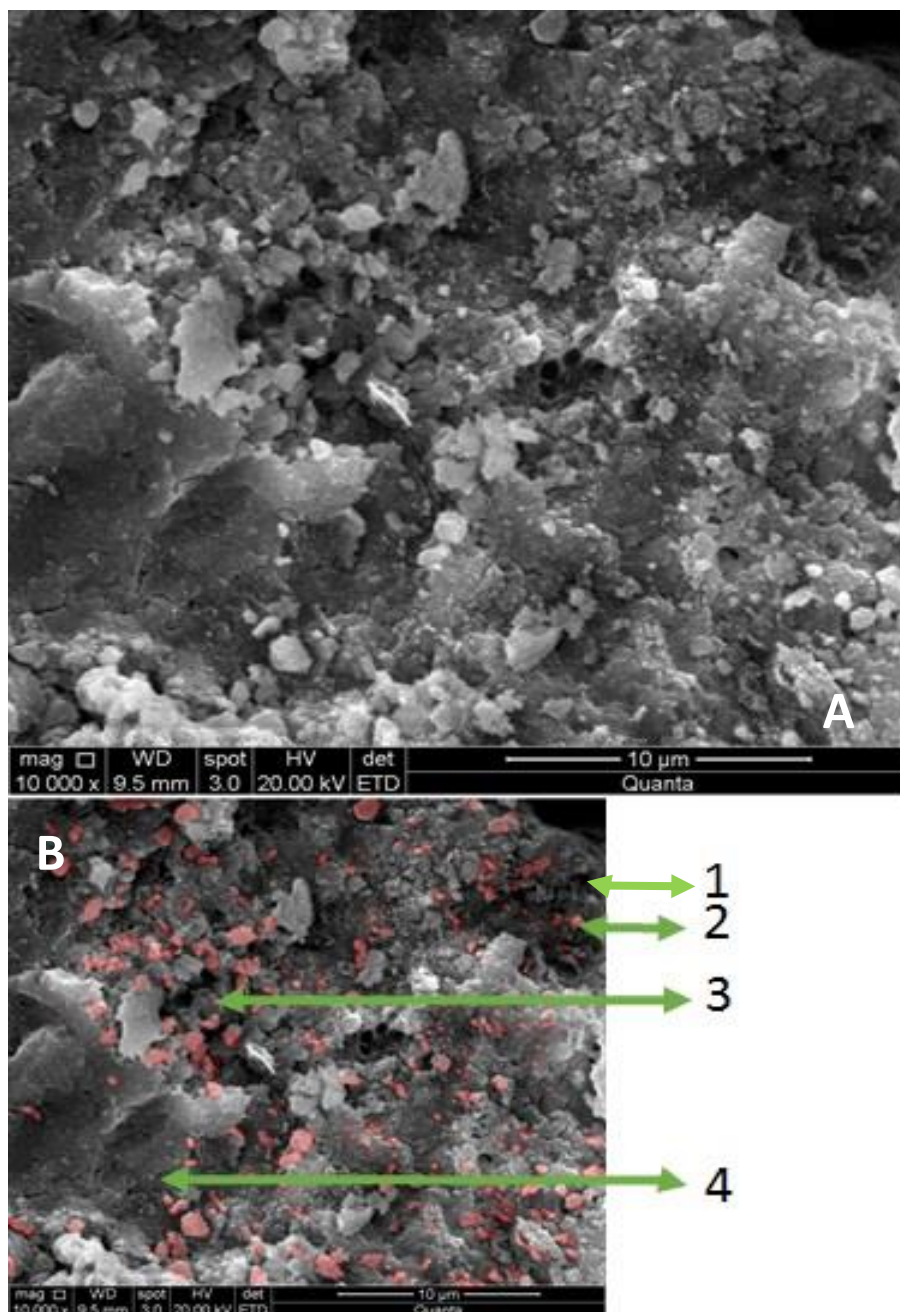


Figura 14 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1793, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.¹⁵

¹⁵ Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; (3) Área interna com microfósseis e cavidades visíveis; (4) Área de superfície externa do cálculo preservada, homogênea, formada por material calcificado (matriz);

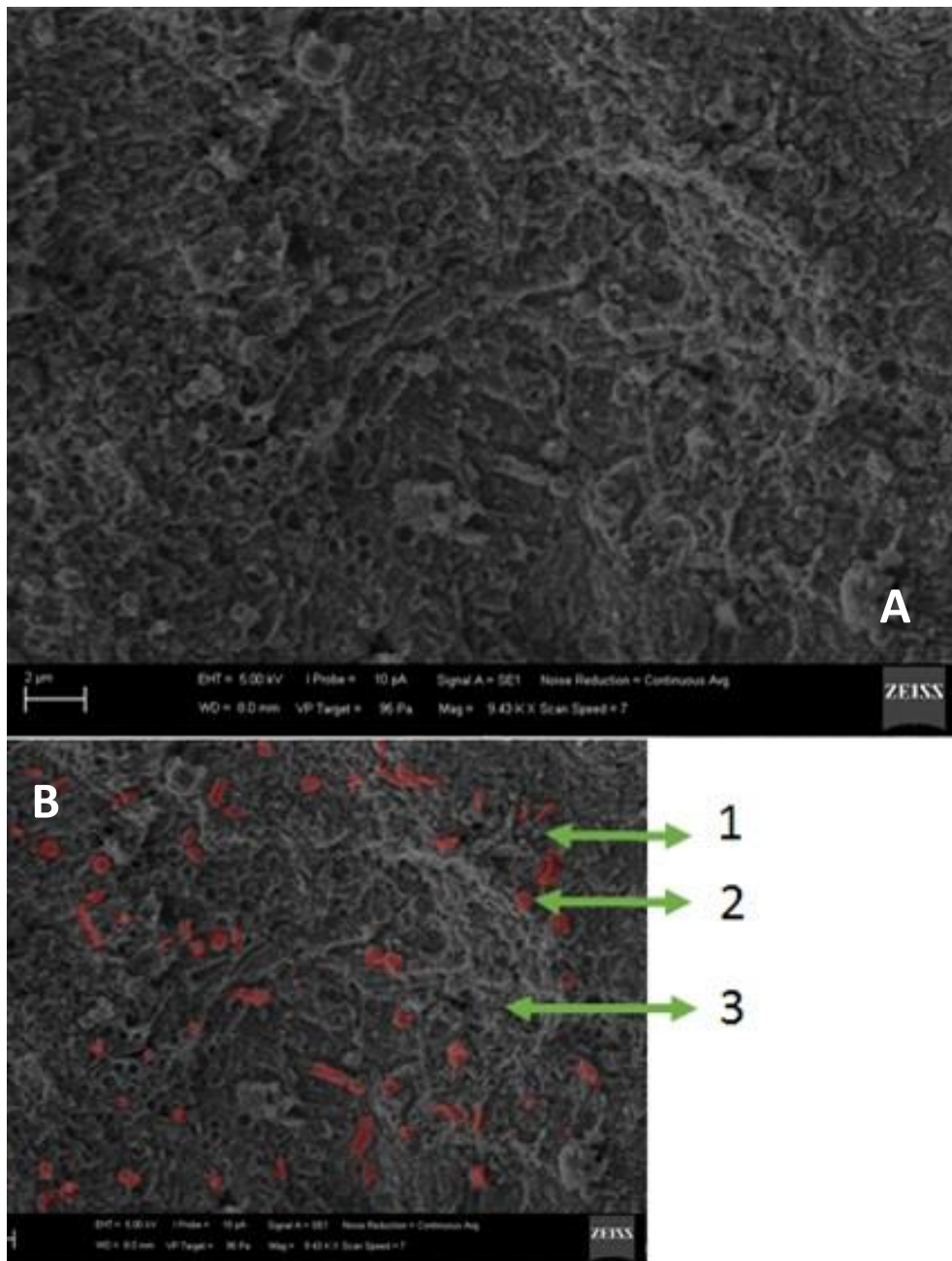


Figura 15 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1796, sambaqui de Cabeçada, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.¹⁶

¹⁶ Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; (3) Área interna com microfósseis e cavidades visíveis;

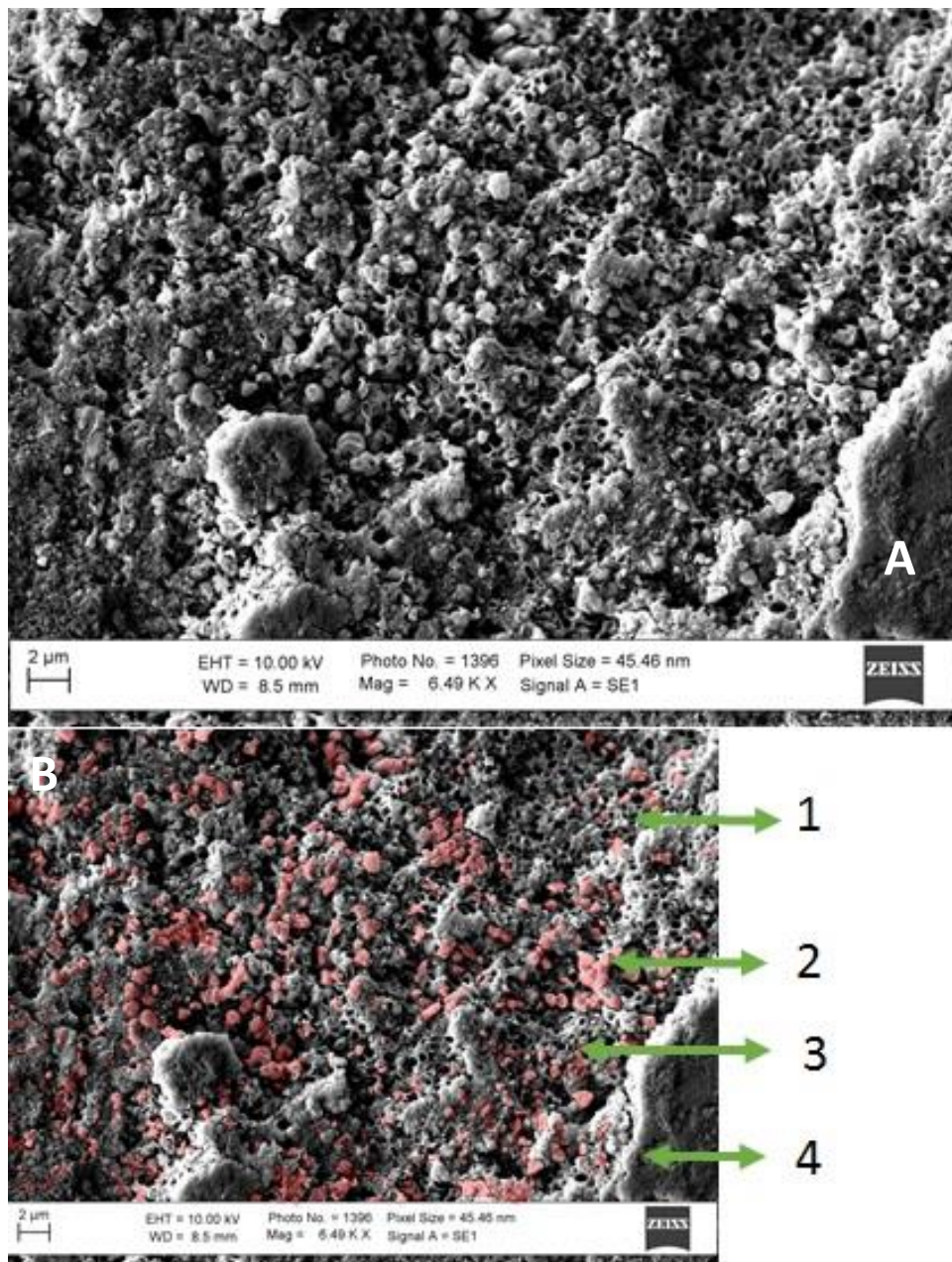


Figura 16 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1916, sambaqui de Cabeçada, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.¹⁷

¹⁷ Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; (3) Área interna com microfósseis e cavidades visíveis; (4) Área de superfície externa do cálculo preservada, homogênea, formada por material calcificado (matriz);

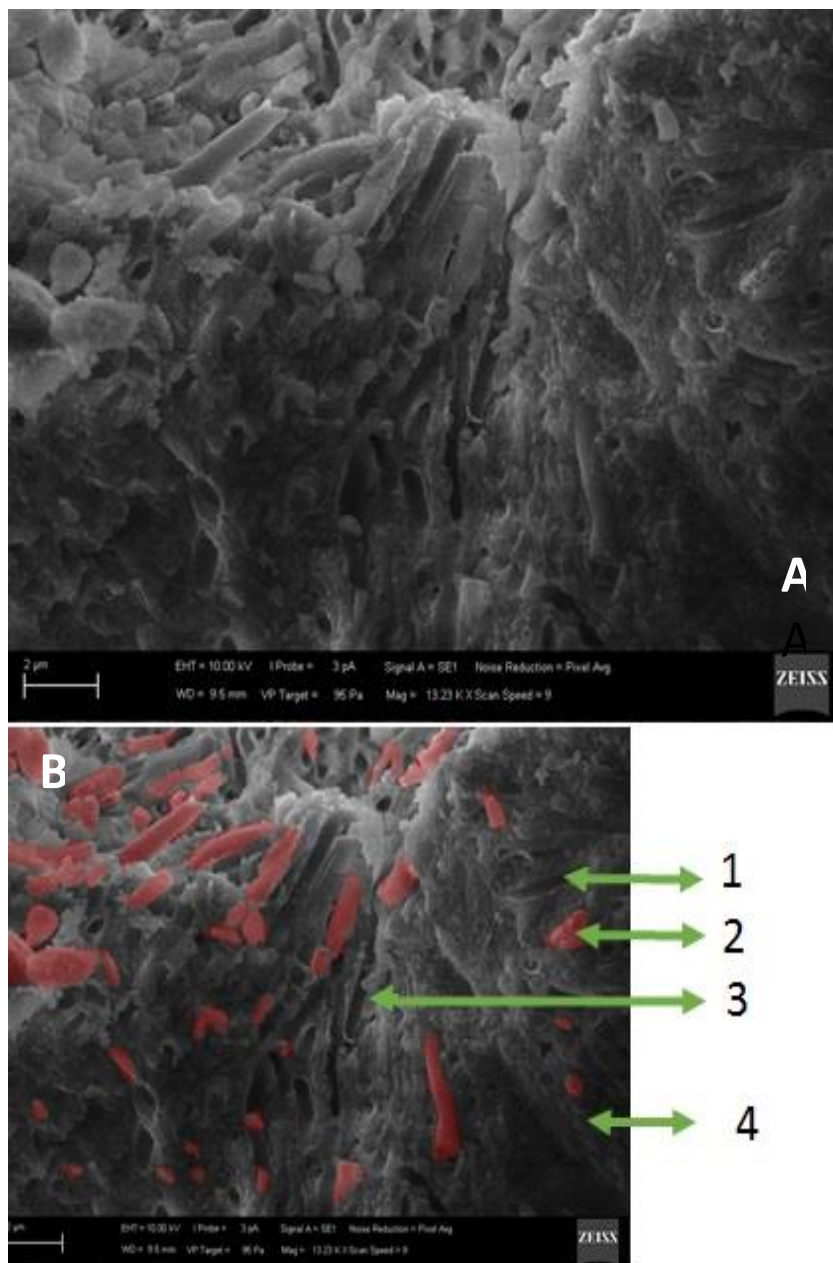


Figura 17 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1918, sambaqui de Cabeçada, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.¹⁸

¹⁸ Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; (3) Área interna com microfósseis e cavidades visíveis; (4) Área de superfície externa do cálculo preservada, homogênea, formada por material calcificado (matriz);

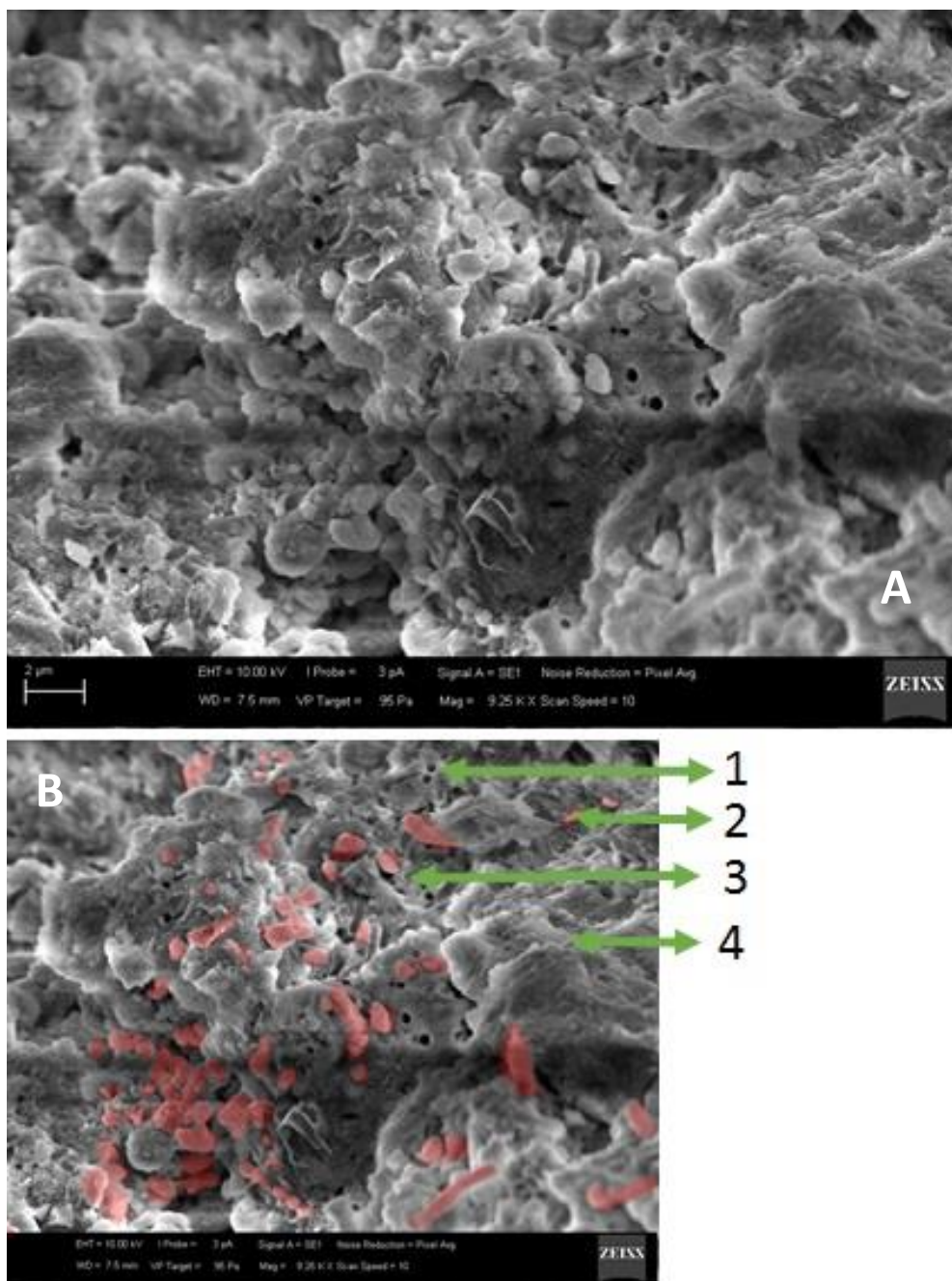


Figura 18 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1920, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.¹⁹

¹⁹ Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; (3) Área interna com microfósseis e cavidades visíveis; (4) Área de superfície externa do cálculo preservada, homogênea, formada por material calcificado (matriz);

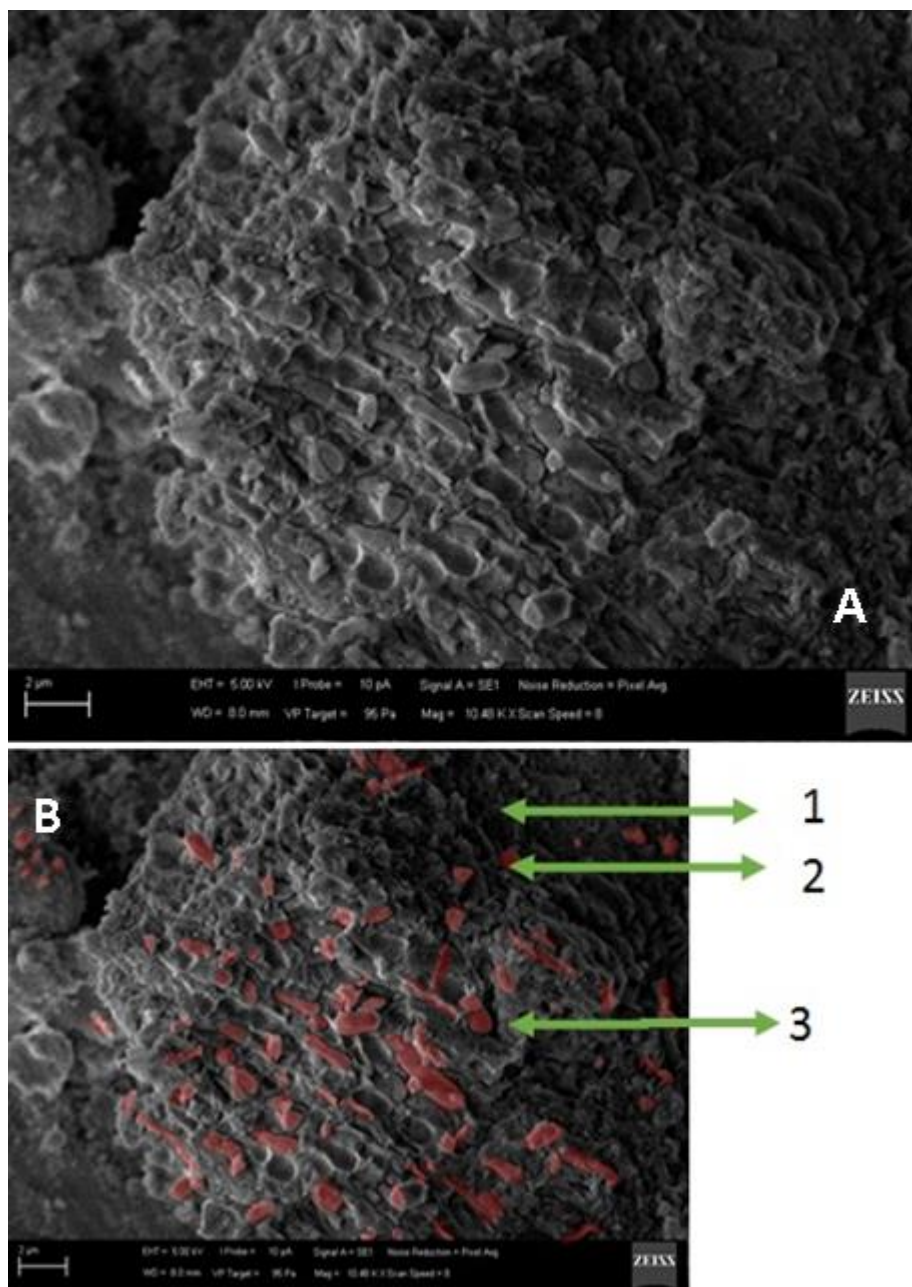


Figura 19 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1924, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.²⁰

²⁰ Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; (3) Área interna com microfósseis e cavidades visíveis;

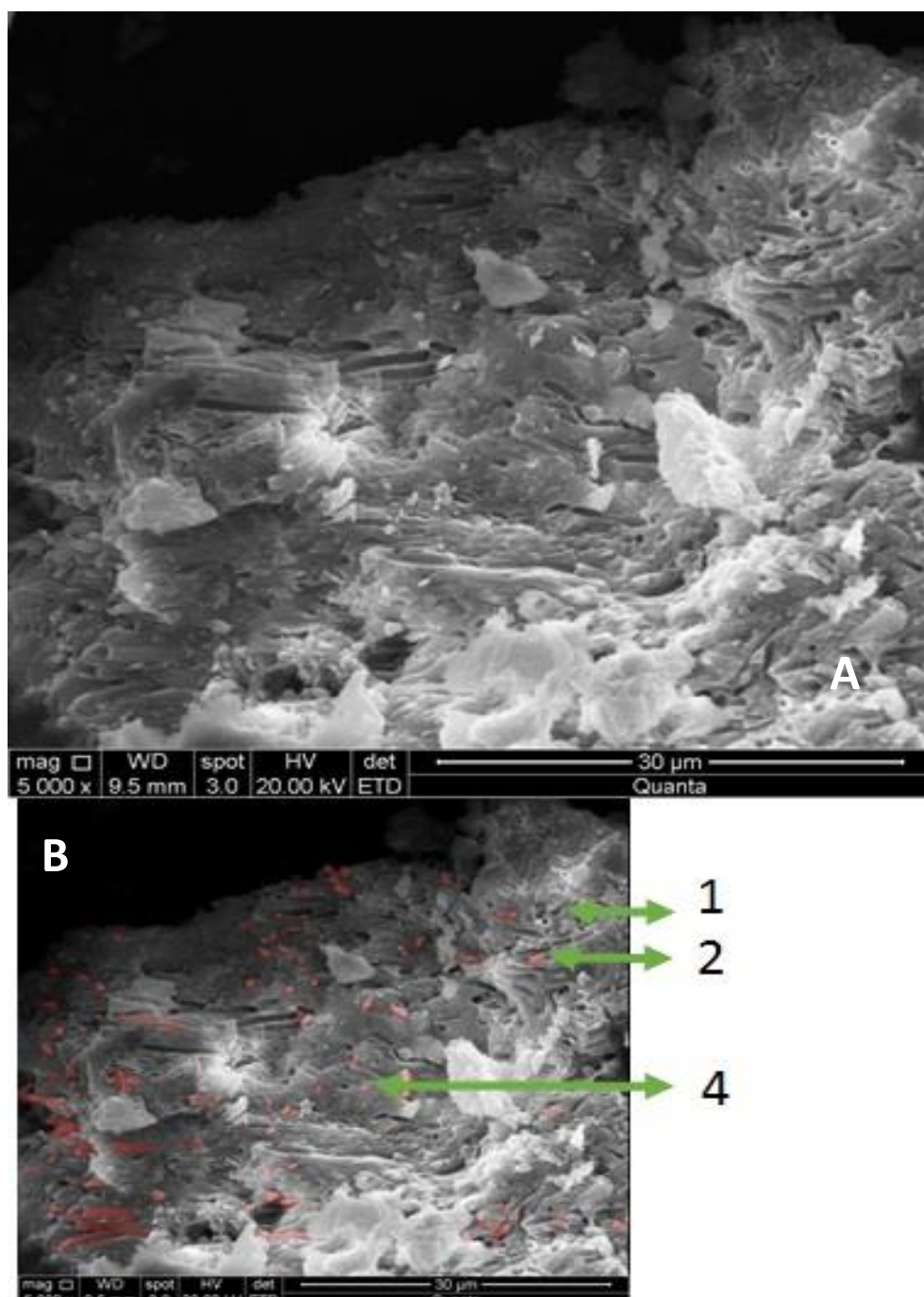


Figura 20 A e B: Cálculo dentário do indivíduo 1942, sambaqui de Cabeçuda, SC, Brasil, em microscopia eletrônica de varredura. Figura B, com microfósseis bacterianos destacados.²¹

²¹ Legenda: (1) Cavidades microbianas; (2) Microfósseis bacterianos; (4) Área de superfície externa do cálculo preservada, homogênea, formada por material calcificado (matriz);

6. DISCUSSÃO

A hipótese que motivou esta pesquisa, que relata a possível presença de bactérias do tipo *Vibrio* na cavidade oral dos construtores do sambaqui de Cabeçuda havida sido proposta inicialmente por Mendonça de Souza (1995). Esta hipótese foi baseada na contaminação de populações que pelo seu estilo de vida, dieta e ambiente em que habitava, estariam frequentemente sujeitos a exposição à água salinas, onde estas bactérias são habituais, e onde se descrevem diferentes espécies entre os quais *Vibrio Parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, e outros (BRAUDE; DAVIES; FIERER, 1986). A presença de *Vibrio* já havia sido referida anteriormente como encontrada na cavidade oral por Gibbons e Van Houte, (1975); Rosebury, (1952); Coolridge, (1946); Smith 1930; Loesche et al. (1985).

Os gêneros de bactérias propostos como presentes na microbiota dos cálculos de Cabeçuda (tabela 3) são consistentes com os descritos na literatura para a placa dentária a partir da qual se formam os cálculos, como por exemplo, os achados de Gibbons e Van Houte (1975), Marcotte e Lavoie (1998) e Marsh et al. (2009), ainda que sua identificação aproximada e apenas morfológica seja precária. Por meio da metodologia escolhida para este trabalho, tais bactérias não puderam ser plenamente confirmadas, para tanto seria necessário a extração de aDNA, ou estudos baseados em RNA de lesões cáries, para revelar o diverso ecossistema que pode ter uma pequena fração de uma comunidade bacteriana, como aponta Simon-Soro e Mira (2014) em seus estudos recentes. Para tais procedimentos é necessário um tempo maior de estudo, o que não seria possível devido até mesmo ao tempo e pelas condições laboratoriais disponíveis para o mestrado.

Embora não tenha sido confirmada a presença de *Vibrio* nos cálculos dentários deste estudo, os trabalhos de Gibbons e Van Houte (1975), Rosebury (1952), Coolridge (1946), Smith (1930), reconhecem este gênero como um daqueles presentes na cavidade oral humana, como citado anteriormente. A presença de microfósseis com formas compatíveis com vibriões e em tamanhos correspondentes aos descritos na literatura foi observada em algumas fotografias, entretanto não há preservação de detalhes nos microfósseis para confirmar esta possibilidade, nem excluí-la. Uma vez que segundo a literatura, os vibriões, ainda que presentes na cavidade oral, não são importantes povoadores da placa dentária, o seu achado no presente caso seria pouco provável, mesmo que os mesmos colonizassem as mucosas, tal como proposto por Mendonça de Souza em sua tese (MENDONÇA DE SOUZA, 1995).

Dos 10 gêneros que puderam ser propostos como possíveis atuadores no cálculo dentário, encontrados neste trabalho, apenas 3 são classificados como cariogênicos ou participantes deste processo: *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Actinomyces* spp. Contudo, de acordo com os autores Nyvad e Kilian (1990), Loesche (1986), Metee et al. (1993), Tadashi e Nyvad (2008), Kleinberg (2002) e Nunes et al (2007) para que estas bactérias se estabeleçam na placa dentária, e para que atinjam um crescimento que represente um risco de causar cárie, é necessário todo um ambiente, principalmente relacionado ao pH da boca. Estes tipos de bactérias necessitam de um meio ácido para se estabelecerem, e se estiverem em quantidade pouco significativa, não são capazes de induzir o processo de formação de cárie. Bactérias do tipo *Actinomyces* spp., e *Streptococcus* spp. foram relatadas como predominantes na fase inicial da formação do biofilme (Nunes et al. 2007), mas não necessariamente causando lesões cariosas. Bactérias do gênero *Vibrio*, por outro lado, possuem preferência para crescimento e

reprodução em ambientes com pH alcalinos, logo a acidificação do ambiente inibe o seu crescimento, tal como o de diversos outros micro-organismos, como proposto por Metee et al. (1993).

Os outros gêneros encontrados neste trabalho são relatados como comensais, ou seja, aqueles que são encontradas no cálculo dentário, sem beneficiar ou causar danos ao hospedeiro, como também proposto por Gibbons e Van Houte (1975), Rosebury (1952), Coolridge (1946), Smith (1930) e Nunes et al. (2007). Bactérias do gênero *Vibrio*, não foram confirmadas neste trabalho, não sendo possível observar nada semelhante à morfologia desta bactéria que confirmasse, inequivocamente, a presença da mesma. Por outro lado, sua presença também não pode ser excluída, pois seu tamanho e forma poderiam ser confundidos com outros bacilos, e a visualização de flagelos não seria possível no presente material. Estas bactérias poderiam estar representadas na microbiota oral, localizada em outra parte da boca, como por exemplo, o sulco gengival, como propõe Santos (1978). Neste caso, pela sua proximidade, poderia estar interferindo no crescimento da placa, através do mecanismo de comunicação entre bactérias “quórum sensing”, ainda que ausente de fato nos cálculos dentários.

Ao considerar a presença de vibriões na microbiota oral deste grupo sambaquieiro, outros aspectos devem ser levados em conta. Dickschat (2009) aponta em sua pesquisa as bactérias do gênero *Vibrio* como capazes de intervir na formação do biofilme bacteriano e de grande importância em relação à expressão de fatores de virulência. Segundo o referido trabalho, os biofilmes têm como sua base estrutural polissacarídeos que fornecem proteção contra estresses ambientais. Em algumas bactérias, como nos *Vibrio*, as formações desses polissacarídeos são reguladas pelo

chamado “quórum sensing”, um processo que envolve moléculas auto-indutoras de formação de biofilme. É plausível discutir que mesmo *Vibrio* possuindo a característica de inibir a formação de biofilme, poderia afetar a formação da placa bacteriana depositada sobre o dente, principalmente se levarmos em conta sua localização preferencial (SANTOS, 1978). Mesmo que o grupo sambaquieiro estudado não o possuísse em sua microbiota de placa em quantidade expressiva, este tipo bacteriano poderia estar presente na microbiota oral, exercendo influência por proximidade sobre os biofilmes dentários.

Não foi realizado um estudo quantitativo em relação aos possíveis tipos de bactérias, devido a estas possuírem características e variações em suas dimensões muito semelhantes, o que dificultou o diagnóstico específico e a contabilização das mesmas. Contudo, neste trabalho foi proposta uma abordagem que permitisse aproximar a densidade de microfósseis existentes por área total das imagens estudadas, sendo realizado o cálculo de densidade para relativizar a quantidade de microfósseis/cavidades existentes por μm^2 , reduzindo o viés que poderia ter sido ocasionado pelas diferentes magnificações das imagens.

Na maior parte das amostras houve flutuação do valor dentro de uma faixa relativamente próxima, que variou entre 0,10 μm^2 . e 0,50 μm^2 . A maior exceção foi o valor encontrado no exemplar 1674, cujo resultado foi, aparentemente, discrepante. Este valor representou um número muito reduzido de microfósseis/cavidades no cálculo, ou seja, baixa densidade de bactérias, o que poderia dever-se ao fato da face fotografada não representar uma área do cálculo com bactérias, mas sim uma porção superficial ou de contato com o dente. É possível observar as diferenças entre as densidades na tabela 2 e no gráfico 1.

As diferentes densidades podem ser explicadas pela velocidade de formação do cálculo dentário, pois o cálculo dentário que possui formação muito acelerada, não gera o tempo necessário para colonização seguida da multiplicação de bactérias patogênicas, como proposto por Aneroud, Løe e Boyser (1991). Neste caso, o cálculo com baixíssima densidade de bactérias poderia ser também um caso extremo de formação acelerada.

Ajdic et al. (2002), preconiza que as bactérias presentes no biofilme precisam se adaptar as variações drásticas dos nutrientes disponíveis. É sabido que a alimentação desses grupos sambaquieiros era essencialmente hipocalórica, com baixa introdução de carboidratos/açúcares, cuja fonte era principalmente plantas da flora natural, não domesticadas. Logo, o ambiente da boca, neste caso, com pouco carboidrato de fermentação rápida, e meio pouco ácido, modularia a formação do biofilme. A baixa ingestão de carboidratos e amidos, e a alta ingestão de proteína, como ocorre na população do sambaqui de Cabeçuda, contribui assim para explicar a baixa prevalência de cárie nestes grupos, influenciando na proporção dos tipos bacterianos presentes, mesmo que entre eles houvesse alguns cariogênicos como *Lactobacillus* spp, *Actinomyces* spp., e *Streptococcus* spp. Tal como destacam Wesolowski e colaboradores (2007), esta condição de dieta hiperproteica, liberando radicais amoniacaís e mantendo o pH alcalino, aceleraria a formação dos cálculos.

Rodrigues-Carvalho e Souza (2003) e Mendonça de Souza (1995), propõem que independentemente do estilo de vida do grupo sambaquieiro de construtores de Cabeçuda, e das condições ambientais que viviam esses grupos, a possibilidade de uma ecologia bucal não favorável a doença cárie deve ser considerada. A alta exposição as águas salinas e a alta probabilidade de incorporar as bactérias presentes neste ambiente

na microbiota oral, até mesmo pela fonte de alimento ser de origem marinha, fundamenta a hipótese de que os *Vibrio*, ainda que não confirmados aqui, provavelmente estivessem presentes na microbiota oral, podendo agir sobre a formação de placa e a colonização.

Diante da análise morfológica dos microfósseis, os cálculos dentários analisados neste trabalho mostraram-se semelhantes em sua composição e tipo de microbiota, o que resulta em um padrão detectado para estes grupos. Foi avaliado se haveria interferência em relação a posição a qual estes indivíduos/dentes se encontravam originalmente no sítio. Para avaliar essa situação, foi observado o nível o qual se encontravam originalmente no sítio arqueológico e pôde-se observar que todas as amostras se encontravam na mesma condição paleoepidemiológica.

O cálculo dentário possui uma superfície interna de contato com o dente e uma superfície externa. Quando há a fragmentação do cálculo, como ocorreu neste trabalho, não há como saber o que originalmente é superfície e o que é a parte interna. A diferença quantitativa pode estar relacionada com a parte do cálculo que foi extraída para análise. O cálculo dentário não é homogêneo, possuindo uma estratificação, até mesmo em relação a colonização das bactérias. Como citado anteriormente, algumas bactérias fixam primeiro no cálculo, como descrito por Nunes et al. (2007), e a variação de padrão observada nas imagens sugere que em alguns casos podemos ter documentado partes iniciais da formação das placas e em outras partes mais periféricas.

Não havendo definição de idade e sexo ou conhecimento de diferenças sociais entre eles, não foi possível correlações sobre pequenas diferenças nos cálculos com outras características de interesse epidemiológico.

Para os fatores imunológicos, é conhecida a presença da imunoglobulina A (SIgA) na cavidade oral, e esta atua na fase de formação inicial da placa dentária. (SCANNAPIECO; LEVINE, 1999; FUBARA; FRETER, 1973). Robertson et al. (1978) e Robertson et al. (1980), apontam nos resultados de suas pesquisas que humanos deficientes de SIgA são mais ou menos suscetíveis à cárie. Este fator também foi estudado por outros autores (KILIAN ET AL. 1981; REINHOLDT; KILIAN, 1987; LILJEMARK et al., 1979), e constatado que esta imunoglobulina presente na cavidade oral, tem a capacidade de inibir ou promover a adesão de certas bactérias orais no dentes. Por meio destes resultados gerados por estes autores, se faz possível discutir a possibilidade de uma alta concentração de SIgA na cavidade oral destes grupos sambaqueiros, e conseqüentemente uma baixa adesão de bactérias de bactérias cariogênicas, como a principal atuante, *S. mutans*, como foi demonstrado no estudo de Michalek e Childers (1990) que realizou experiência com modelos animais e mostrou que a presença de SIgA induzido contra *S. mutans* leva a uma redução na colonização da bactéria bem como na prevenção de cáries. Estes resultados nos possibilitam pensar em um grupo que talvez possuísse altos níveis de SIgA na cavidade oral.

Em relação à cadeia de transmissão de micro-organismos, ao nascer, nos infectamos com os micro-organismos presentes em pessoas as quais mantemos mais contato, como pai e mãe tal como preconizado por Gronroos et al. (1998), Kohler et al. (1983) e Li et al. (1983). Tendo vista a cadeia de transmissão existente entre mães e filhos, devemos considerar a ecologia a qual estes grupos sambaqueiros estavam expostos, incluindo a presença dos *Vibrio* na superfície corporal da mãe, devido seu frequente contato com águas salinas. Esta exposição dos lactentes até a idade do desmame e erupção dentária, poderia causar mudança na dinâmica dos biofilmes,

sujeitos à introdução microbiota oral de *Vibrio*, interferindo na instalação de espécies cariogênicas.

Os indivíduos pertencentes ao sambaqui de Cabeçuda, por outro lado, também poderiam apresentar uma baixa suscetibilidade para o desencadeamento de cárie, como proposto por Oliveira Lima (2007), que menciona que essa suscetibilidade é determinada por fatores extrínsecos, como por exemplo, estrutura sociocultural e os aspectos imunológicos e hereditários.

Há diversos trabalhos sobre cálculo dentário realizados com abordagens paleoepidemiológicas sobre os dentes do Sambaqui de Cabeçuda, e outros sítios do mesmo tipo, em especial os realizados por Salles Cunha (1963), Mendonça de Souza (1995), Rodrigues-Carvalho (2006) e Wesoloswki (2007), todavia, nos trabalhos realizados não houve pesquisas voltadas para a parte de bacteriologia dos cálculos, estudava-se a ausência ou a baixa prevalência de cárie, porém em relação a outras vertentes, principalmente voltadas para alimentação e desgastes dentários. Apesar da modesta contribuição, este é o primeiro trabalho a ser realizado para evidenciar e tentar identificar, ainda que com base em morfologia, as bactérias presentes em cálculos dentários do sambaqui de Cabeçuda. Outros estudos tal como existentes na literatura poderão dar seguimento a este, tanto utilizando outros tipos de microscopia como utilizando análises bioquímicas e de paleogenética. Estes estudos em breve poderão oferecer respostas mais detalhadas. Muito embora seja apenas uma contribuição inicial à paleoepidemiologia da cárie dentária, do ponto de visto ecológico e dos seus possíveis agentes etiológicos (bactérias), foi possível apontar evidências e oferecer dados, que poderão levar a pesquisas futuras na continuidade da investigação do tema.

Outras técnicas, como, por exemplo, a de biologia molecular, realizado por Warrier et al. (2015), fazendo sequenciamento das bactérias presentes nos cálculos dentários arqueológicos; ou a análise imuno-histoquímica e microscopia eletrônica de transmissão marcado por ouro, como realizado por Preus et al (2011), poderão ser aplicadas para contribuir na investigação deste tema, pois se faz necessário uma maior exploração deste material, de modo a obter uma identificação mais precisa das bactérias presentes nos cálculos dentários.

A continuidade dos testes para a desagregação dos cálculos deverá proporcionar no futuro melhores abordagens para o estudo morfológico de microfósseis, pois atualmente nos deparamos com problemas ainda metodológicos. O cálculo varia de tamanho, então quando removido, o mesmo se particiona, perdendo o controle de qual parte do cálculo está sendo analisada. Somando-se a este fato, não foi possível posicionar os cálculos dos diferentes exemplares, da mesma maneira no “*stub*”, e este fator dificultava a interpretação das fotografias e a padronização do tamanho das fotos. Ainda em relação a metodologia, pôde ser visualizado nesta pesquisa que para a observação/realização de amostras arqueológicas, o microscópio Quanta 250 (FEI company), se mostrou mais eficiente, com melhores resoluções de imagens, até mesmo devido a quilovoltagem, quando comparado ao microscópio Zeiss EVO MA10. Finalmente, o melhor entendimento do processo de formação dos microfósseis e a variação de sua preservação poderá permitir a inovação de técnicas para estudos futuros.

7. CONCLUSÃO

- Diferentes tipos de bactérias estão preservadas nos cálculos dentários de Cabeçuda, tanto na forma de microfósseis como de cavidades moldadas na matriz mineralizada. Os gêneros compatíveis com as morfologias encontradas foram os seguintes: *Lactobacillus* spp.; *Porphyromonas* spp. *Actinomyces* spp.; *Lepotrichia* spp.; *Rothia* spp.; *Nisseria* spp.; *Staphylococcus* spp.; *Peptrostreptococcus* spp.; *Streptococcus* spp.
- Embora não tenha sido possível confirmar, inequivocadamente, a presença de *Vibrio*, também não é possível afastar sua existência nos cálculos dentários do grupo do Sambaqui de Cabeçuda
- Embora não tenha sido possível confirmar a proporção dos diferentes tipos, a densidade de micro-organismos nos exemplares estudados pode ser aproximado para cada área fotografada, variando de 0,056 μm^2 a 0,82 μm^2 .
- É proposto aqui, como modelo ecológico a ser testado futuramente, a possível atuação do *Vibrio* (mesmo ausente dos cálculos) na formação e crescimento do biofilme que forma as placas; e ainda, que a velocidade de formação do cálculo seria outro fator detendo da placa e seu potencial cariogênico.

REFERÊNCIAS

- ADLER, C.J.; DOBNEY, K.; WEYRICH, L.S.; KAIDONIS, J.; WALKER, A.W.; HAAK, W.; BRADSHAW, C.J.A.; TOWNSEND, G.; SOŁTYSIAK, A.; ALT, K.W.; PARKHILL, J.; COOPER, A. Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. **Nat. Genet.**, 45,450–455, 2013.
- AJDIC, D; MCSHAN, W.M.; MCLAUGHLIN, R.E.; SAVIĆ, G.; CHANG, J.; CARSON, M.B.; PRIMEAUX, C.; TIAN, R.; KENTON, S.; JIA, H.; LIN, S.; QIAN, Y.; LI, S.; ZHU, H.; NAJAR, F.; LAI, H.; WHITE, J.; ROE, B.A.; FERRETTI, J.J. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proc.Natl.Acad.Sci .U.S.A**, 99:14434-14439, 2002.
- ANDRADE LIMA, T. **Dos mariscos aos peixes: um estudo zooarqueológico da mudança de subsistência na pré-história do Rio de Janeiro**. Tese de doutorado. Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 691p. 1991.
- ANDRADRE LIMA, T. Em busca dos frutos do mar: os pescadores-coletores do litotal Centro-sul do Brasil. **Revista USP**, São Paulo, n.44, p. 270-327, dezembro/fevereiro, 2000.
- ANEROUD, A.; LÖE, H.; BOYSER, H. The natural history and clinical course of calculus formation in man. **J. Clin. Periodontol.** 18:160-70, 1964.
- ARENSBURG, B. Ancient dental calculus and diet. **Hum. Evol.** 11, 139– 145, 1996.
- BATH-BALOGH M., FEHRENBACH, M. **Anatomia, Histologia e Embriologia dos Dentes e das Estruturas Orofaciais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- BOLDSEN., J.L.; MILNER, G.R. An Epidemiological Approach to Paleopathology. In: Grauer AL (ed.). **A Companion to Paleopathology**. 1 ed. United Kingdom. Blackwell Publishing.; p. 114-132, 2012
- BRATTHALL, D., GIBBONS, R. J. Mudando atividades de aglutinação de preparações uma imunoglobulina salivar contra estreptococos oral. **Infect. Immun.** 11 :. 603-606, 1975.
- BRAUDE, A.I.; DAVI, S.C.E.; FIERER, J. **Infect. Dis. and Med. Microbiol.** Phyladelphia, W.B. Saunders, 1986.
- BROTHWELL, D. **Digging up bones**. London, UK: London Museum, 1972
- BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 8.ed., Baltimore, The Williams & Wilkins, 1975.

BURT, B. A. et al. The effects of sugars intake and frequency of ingestion on dental caries increment in a three-year longitudinal study. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 67, p. 1422-1429, 1988

CAUFIELD, P.W; CUTTER, G.R.; DASANAYAKE, A.P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **J. Dent.Res.** 72:37-45, 1993.

CAUFIELD, P. W.; DASANAYAKE, AP.; LI, Y.; PAN, Y.; HSU, J.; HARDIN, J.M. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. **Infect.Immun.** 68:4018-4023, 2000.

CASTRO FARIA , L. **De Schulptures en pierre des paleoamériens de la cote meridionale du Brésil : les zoolithes de Santa Catarina** . In : IVe. . Congrès Internationale des Sciences Anthropologiques et Ethnologiques. Viena, 1955.

CALDWELL, R.C. Physical properties of food and their caries-producing potential. **J. Dent. Rev.** (suppl): 1293 – 98, 1970.

CLAASSEN, C.; SHELLS. **Cambridge Manuals in Archaeology**. Cambridge: University Press, 266p. 1998

COHEN, M.N.; ARMELAGOS, G.J. **Paleopathology at the origins of agriculture**. Nova York: Academic Press. 615p, 1984.

COOLRIDGE. **Clinical pathology and treatment of dental pulp and periodontal tissues**. 2nd ed. Lea and Febiger p. 294, Philadelphia, 1946.

CRITCHLEY, P., BOWEN, W.H. **Correlation of the biochemical composition of plaque with the diet**. In: McHugh WD, Editor. Dental plaque. Dundee: Thompson & Co Ltd., 157-169, 1970.

CURTIS, M.A.; SLANEY, J.M.; ADUSE-OPOKU, J. Critical pathways in microbial virulence. **J. Clin. Periodontol.** 32 (suppl. 6) : 28-38, 2005.

DICKSCHAT, J.S. Quorum sensing and bacterial biofilms. Quorum sensing and bacterial biofilms, 2010.

DITTERICH, R.; ROMANELLI, M., RASTELLI, M; WAMBIER. Cárie de acometimento precoce: uma revisão. Publ. UEPG Ci. **Biol. Saúde**, Ponta Grossa, 10 (3/4): 33-41, set./dez, 2004.

DOBNEY, K.; BROTHWELL, D. Dental calculus: its relevance to ancient diet and oral ecology. **Teeth Anthropol.** 291, 55 – 81, 1986.

DOBNEY, K.; BROTHWELL, D. **A scanning electron microscope study of archaeological dental calculus**. In: Scanning electron microscopy in archaeology, BAR International Series, vol. 452 (ed. S Olsen), pp. 372– 385. Oxford, UK: BAR, 1988.

DOBNEY, K. **Study of the dental calculus**. In The Jewish burial ground at Jewbury (eds J Lilley, G Stroud, D Brothwell, M Williamson). York, UK: Council for British Archaeology, 1994

ESHED, V.; GOPHER, A., HERSHKOVITZ, I. Tooth wear and dental pathology at the advent of agriculture: new evidence from the Levant. **Am. J. Phys. Anthropol.** Volume 130, Issue 2, pages 145–159, June, 2006.

FEJERSKOV, O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 25, no. 1, p. 5-12, Feb. 1997.

FEJERSKOV, O; NYVAD, B.; KIDD, E.A.M. **Pathology of dental caries**. In: Fejerskov. O.; Kidd, E.A.M. (eds): Dental Caries. The Disease and Its Clinical Management, ed 2. Oxford, Blackwell Munksgaard pp 19–48, 2008.

FLETCHER M. The physiological acclivity of bacteria attached to solid surfaces. **Adv. Microb. Physiol.** 32:53- 85, 1991.

FUBARA, E.S.; FRETER, R. Protection against enteric bacterial infection by secretory IgA antibodies. **J. of Immunol.** Vol. 111. N.2, 1973.

GAARE, D., ROLLA, G., VAN DEN OUDERAA, F. **Comparison of the rate of formation of supragingival calculus in an asian and a european population**. In ten Cate JM, editor. Recent advances in the study of dental calculus. Oxford: IRL press; p 115-22, 1989.

GASPAR, M.D.; DE BLASIS. P.; FISH, S.K.; FISH, P.R. **Sambaqui (shell mound) societies of coastal Brazil**. In: Silverman H, Isbell WH (eds.). Handbook of South American Archaeology. Ed. Springer p: 319-335, 1984.

GASPAR, M.D. **Uma Reconstituição do modo de vida dos Sambaquieiros: pescadores, coletores e caçadores pré-históricos que ocuparam o litoral brasileiro**. In: Tenório MC, Franco TC (Orgs.). Seminário para implantação da temática pré-história brasileira no ensino de 1º, 2º, 3º graus. Rio de Janeiro: UFRJ/MN; 1994.

GASPAR, M.D. **Sambaqui: arqueologia do litoral brasileiro**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Jorge Zahar. p.89, 2004.

GIANNINI, P.C.F.; VILLAGRAN, X.; FORNARI, M.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.R.; MENEZES, P.M.L.; TANAKA, A.P.B.; ASSUNÇÃO, D.C.; DEBLASIS, P.; AMARAL, P.G.C. **Interações entre evolução sedimentar e ocupação humana pré-histórica na costa centro-sul de Santa Catarina, Brasil**. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Série Ciências Humanas. 5(1):105-128, 2010.

GIBBONS, R.J; VAN HOUTE J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. **Annu. Rev. Microbiol.** 29:19-42, 1975.

GIBBONS, R. J.; SOCRANSKY, S. S.; ARAUJO, W. C.; VAN HOUTE, J. Studies of the predominant cultivable microbiota of dental plaque **Arch. Oral Bioi.** 9:365-70, 1964.

GOODMAN, A.H.; LALLO, J.; ARMELAGOS, G.J.; ROSE, J.C. **Health changes at Dickinson Mounds, Illinois (AD 950-1300)**. In Cohen MN, Armelagos GJ, editores. Paleopathology at the origins of agriculture. Nova York: Academic Press;. p.. 271-306, 1984.

GOODMAN, A. H.; MARTIN, D. L.; ARMELAGOS, G. J.; CLARK, G. **Indications of stress from bone and teeth**. Cohen, M.N.; Armelagos, G.J., editores. Paleopathology at the origins of agriculture. Nova York: Academic Press;. p..13-49, 1984b.

GORDON, D.F.; JONG, B.B. Indigenous microbiota from human saliva. **Appl. Microbiol.**, 1968.

GRONROOS, L.; SAARELA, M.; MATTO, J.; TANNER-SALO, U.; VUORELA, A.; ALALUUSUA. S. Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmission of bacteria from mother to child. **Infect.Immun.** 66:2595-2600, 1998.

GUIMARÃES, M.S.B.C. **Do lixo ao luxo: as premissas teórico-metodológicas e a noção de sambaqui**. Boletim do Museu Nacional, 63:1-23, 2003.

HAM, A.W. **Histologia**. Editora: Guanaraba Koogan. 3ª edição. Rio de Janeiro, 1967.

HAMILTON, W.A. **Biofilms: microbial interactions and metabolic activities**. In: Ecology of Microbial Communities, 41st Symp. Soc. Gen. Microbiol., ed. M Fletcher, TRG Gray, JG Jones. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1987.

HAUBERT, F.; KREVER, M..L.B.; PALMA, L.P.; SCHMITZ, P.I. **Bocas e dentes: O estudo dos esqueletos escavados por P. João Alfredo Rohr, SJ, no litoral de Santa Catarina**. Arqueologia do Rio Grande do Sul, Documentos 9. São Leopoldo: IAP/UNISINOS; 166p, 2004.

HEREDIA, O.R.; BELTRÃO, M.C. **Mariscadores e pescadores pré-históricos do litoral centro-sul brasileiro**. In: Schmitz, P.I. (ed.). Estudos de arqueologia e pré-história brasileira, em memória de Alfredo Teodoro Rusins. Pesquisas. Série Antropologia São Leopoldo; 31:101-119, 1980.

HERSHKOVITZ, I.; SMITH, P.; SARIG, R.; QUAM, R.; RODRÍGUEZ, L.; GARCÍA, R.; ARSUAGA, R.L.; BARKAI, R.; GOPHER, A. Middle pleistocene dental remains from Qesem Cave (Israel). **American Journal of Physical Anthropology**. Volume 144, Issue 4, pages 575–592, 2011.

HILLSON, S. **Dental Anthropology**. Cambridge: Cambridge University Press; 1996.

JØRN, A.; BRUCE, J.; PASTER, L.; LAUREN, N.; STOKES, A.; INGAR, O.; FLOYD, E. Defining the Normal Bacterial Microbiota of the Oral Cavity. **J. Clin. Microbiol.** 43(11):572, 2005.

MCGHEE JR; MESTECKY, J.; DERTZBAUGH, M.T.; ELDRIDGE, J.H.; HIRASAWA, M.; KIYONO, H. O sistema imune das mucosas: dos conceitos fundamentais para o desenvolvimento de vacinas. **Vaccine.** 10 :. 75-88, 1992.

KEYES, P. H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. **Arch.Oral Biol.** 1:304-320, 1960.

KILIAN, M.; ROLLAND K.; MESTECKY, J. Interferência de imunoglobulina A, com absorção de bactérias orais para hidroxiapatita. **Infect. Immun.** 31 :. 935-941, 1981.

KLEINBERG, I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of oral bacteria in dental caries causation: an alternative to Streptococcus mutans and specificplaque hypothesis. **Crit Rev Oral Biol Med** 13: 108-25, 2002.

KLEINBERG, I.; JENKIS, G.N.; DENEPITIYA, L.; CJATTERJEE R. **Diet and dental plaque.** In Ferguson DB, editor. The environment of the teeth. Nova York: Kargel; p. 88-107, 1981.

KLEPINGER, L.L.; KUHN, J.J.; THOMAS JR, J. Prehistoric dental calculus gives evidence for coca in early coastal Ecuador. **Nature** 269, 506 – 507, 1977.

KOHLER, B., D.; BRATTHALL, A.; KRASSE, A. Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium Streptococcus mutans in their infants. **Arch.Oral Biol.** 28:225-231,1983.

KLOKLER, D.M. **Construindo ou deixando um sambaqui? Análise de sedimentos de um sambaqui do litoral meridional brasileiro – processos formativos. Região de Laguna-SC.** Dissertação de Mestrado. São Paulo: Museu de Arqueologia e Etnologia, Universidade de São Paulo 2001.

KOLENBRANDER, P.E. Oral microbial communities: biofilms, Interactions, and Genetic Systems. **Annual Review of Microbiol.** Vol. 54. 2006.

KOLENBRANDER, P.; ROBERT, J; PALMER, J.R.; RICKARD, A.; JAKUBOVICS, N.; CHALMERS, N.; Diaz . **Periodontology** Vol. 42, , 47–79, 2000.

LANGMAN. J. **Embriologia médica.** 2ª edição. Editora: Atheneu Editora. São Paulo, 1970.

LARSEN, C.S. Skeletal and dental adaptations to the shift to agriculture on the Georgia Coast.**Curr. Anthropol.** 22: 422-23, 1981.

LARSEN, C.S. **Bioarchaeology: interpreting behavior from the human skeleton.** Lawin-Scott, H.M.; Costerton, J.W. eds. Microbial Biofilms. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 1995.

LARSEN, C.S. **Health and disease in prehistoric Georgia: the transition to agriculture.** In: Cohen, M.N.; Armelagos, G.J., editores. Paleopathology at the origins of agriculture. NovaYork: Academic Press;. p. 367-92, 1984.

LARSEN, C.S.; ;SCHOENINGER, M.J.; SHAVIT, R., RUSSELL, K.F. dietary Transition on the Southeastern U.S. Atlantic coast. **Int J Anthropol** 5: 333-46, 1990.

LAWRENCE, J.R.; KORBER, D.R.; CALDWELL, D.E. **Surface colonization strategies of biofilm-forming bacteria.** In Adv. Microb. Eco/. 14: 1995. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.

LEIGH, R.W. Dental pathology of Indian tribes of varied environmental and food conditions. **Am. J. Phys. Anthropol.** 8, 179 – 199, 1925.

LILJEMARK, W.F.; BLOOMQUIST, C.G.; OFSTEHAGE, J. C. Agregação e aderência de *Streptococcus sanguis*: papel da imunoglobulina humana salivar A. **Infect. Immun.** 26 :. 1004-1110, 1979.

LI, Y.,; WANG, W.; CAUFIELD, P.W.. The fidelity of mutans streptococci transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among Chinese families. **Caries Res.** 34:123-132, 2000.

LIEVERSE, A.R. Diet and the aetiology of dental calculus. **Int. J. Osteoarchaeol.** 9, 219 – 232, 1999.

LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol. Rev.** 50: 353-80, 1986.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol. Rev.** 50:353-380, 1986.

LOESCHE, W. J. "Ecologia da microbiota oral." **Microbiologia oral e Imunologia** 2. 264-274, 1994.

LOESCHE, W.J.; SYED, S.A.; SCHMID, E.; MORRISON, E.C. Bacterial Profiles of Subgingival Plaques in Periodontitis. **J. Periodontol.** Vol. 56. N. 08, 1985.

LUDOVICO, SBORDONE, CLAUDIA BORTOLAIA. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. **Clin Oral Invest.** 7:181–188, 2003.

LUKACS, J.R. Dental **paleopathology: Methods for reconstructing dietary patterns.** In Iscan, M.Y.; Kennedy, K.A. editores. Reconstruction of life from the skeleton. Nova York: Alan R. Liss;. p 261-86, 1989.

LUKACS, J.R.; PAL, J.N. Mesolithic subsistence in north India: inferences from dental attributes. **Current Anthropol.**, 1993.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M.C. ECOLOGIA microbiana oral e o papel da imunoglobulina A salivar. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62 (1): 71-109, 1988.

MATEE et al. Mutans streptococci in caries-active and caries-free infants in Tanzania. **Oral Microbiol. Immunol.** 8:322-324, 1993.

McNABB; P.C.; TOMASI, T. B. mecanismos de defesa do hospedeiro em superfícies mucosas **Annual Ver. Microbiol.** 35 :. 477-49, 1981.

MANDEL, I.D. **Carie dental: outra doença extinta?** In: Bowen, W.H.; Tabak, L.A. organizadores. Cariologia para a década de 90. São Paulo: Editora Santos;. p. 1-10, 1995a.

MANJI, F.; FEJERSKOV, O.; NAGELKERKE, N.J.; BAELUM, V: A random effects model for some epidemiological features of dental caries. **Community. Dent. Oral Epidemiol.** 19(6):324-8, 1991.

MARSH, P.D.; MARTIN, M.V. **Oral Microbiology** 5nd, ed. Elsevier. Edinburgh London New York Oxford Philadelphia St Louis Sydney Toronto, 2009.

MARSH, P.D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv. Dent. Res.**, Washington, D. C., v. 8, no. 2, p. 263-271, July 2010.

MENDONÇA DE SOUZA, S.F.M; CARVALHO, D.M.; LESSA, A. Paleoepidemiology: Is there a case to answer? Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98 Suppl II.: 21-27, 2003.

MENDONÇA DE SOUZA, S.M.F.. **Osteologia humana, paleopatologia e inferência arqueológica: Uma reflexão sobre o valor dos dados.** Im Mazz JML; Sans M; editores. Arqueologia y Bioantropologia de las tierras bajas. Montevideo: Facultad de humanidades y ciencias de la education/Universidade de la república. p.189-203, 1999.

MENDONÇA DE SOUZA, S.M.F.. **Estresse, doença e adaptabilidade: Estudo comparativo de dois grupos pré-históricos em perspectiva biocultural.** [PHD thesis] Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, 1995.

MENDONÇA DE SOUZA, S.F.M.; WESOLOWSKI, V.; RODRIGUES-CARVALHO C. **Teeth, nutrition, anemia, infection, mortality: costs of lifestyle at the coast Brazilian sambaquis.** Anais do XV Congresso da União Internacional das Ciências Pre-históricas e Proto-históricas – UISPP, set 4-9; Lisboa, Portugal, 2006.

MICHALEK, S.M.; CHILDERS, N. K. Desenvolvimento e perspectivas para uma vacina contra a cárie **Crit. Rev. Oral Med. Biol.** 1 :. 37-54, 1990.

MOLNAR S.; MCKEE, J.K.; MOLNAR, I.M.. Przybeck T.R. Tooth Wear Rates Among Contemporary Australian Aborigines. **J. Dent. Research.** 1983

NEWBURN, E. Sugar and dental caries: A review of human studies. **Science**; 217: 418-23. 1982.

NEWMAN, P.; MACFADYEN, E.E.; GILLESPIE, F.C.; STEPHEN, K.W. An in-dwelling electrode for invivo measurement of the pH of dental plaque in man. **Arch. Oral Biol.** 24: 503–507. 1979.

NEVES, W.A; WESOLOWSKI, V. **Economy, nutrition and disease in prehistoric coastal Brazil: A case study from the state of Santa Catarina.** In Steckel RH; Rose JC. editores. The backbone of History: Health and nutrition in the western hemisphere. Cambridge: Cambridge University Press;. p. 376-405, 2002.

NYVAD, B.. **Microbial colonization of human tooth surfaces.** APMIS, Copenhagen, v. 101, no. 32, p.1-45,. Supplement, 1993.

NYVAD, B.; KILIAN, M. Microbiology if the early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. **Scand. J. Dent. Res.**; 95: 369–380, 1987.

NYVAD, B.; KILLIAN, M. Comparison of the initial strptococcal micromicrobiota on dental enamel in carie-active and in carie-inactive individuals. **Caries Res.**; 24: 267-272, 1990.

NUNES, M.C.P.; CASATI, M.Z.; VILLALPANDO, K.T.; CIRANO, F.R. Contribuição do estudo do biofilme dentário para o tratamento das doenças periodontais. **Rev. Inst. Ciência e Saúde**, 25 (1): 55-61, 2007.

OLIVEIRA LIMA, J.E. Cárie dentária: um novo conceito. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial.** Maringá, v. 12, n. 6, p. 119-130, nov./dez. 2007.

ORSTAVIK, D. **Initial bacterial adhesion to surfaces: ecological implications in dental plaque formation.** In: ten Cate JM, Leach SA, Arends J, Editors. Bacterial adhesion and preventive 1984.

ORTNER, D.J. What skeletons tell us. The story of human paleopathology. **Virchows Arch.**; 459:247-254. 2011.

PASTER, B. J., S. K; BOCHES, J. L; GALVIN, R. E.; ERICSON, C. N.; LAU, V. A.; LEVANOS, A. SAHASRABUDHE, F. E;. DEWHIRST. 2001. Bacterial diversity inchuman subgingival plaque. **J. Bacteriol.** 183:3770–3783.

PAP I; TILLIER, A.M.; ARENSBURG, B.; WEINER, S.; CHECH, M. First scanning electron microscope analysis of dental calculus from European Neanderthals: Subalyuk (Middle Paleolithic, Hungary). Preliminary report. Bull. **Mem. Soc. Anthropol.** Paris 7, 69 – 72, 1995.

PEREIRA, G.A.; NEVES, M.A.; TRINDADE, C. A. Imunologia da Carie dentária. **Acta. Med. Port.**; 23: 663-668, 2010.

PFISTER, L.A. **Bacterial diseases of coastal in evolutionary perspective.** 1st Paleopathology Association Meeting In South America, Program and Abstracts, Pag. 06, 2005.

PREUS, H.R.; MARVIK, O.J.; SELVIG, K.A.; BENNIKE, P. Ancient bacterial DNA (aDNA) in dental calculus from archaeological human remains. **J. Archaeol. Sci.** 38, 1827– 1831, 2011.

REINHOLDT, J; KILIAN. Interferência de IgA protease com o efeito de IgA secretora na aderência de estreptococos orais a hidroxiapatita revestidas de saliva **J. Dent. Res.** 66: 492-497, 1987.

RIVIERE, G.R., WAGONER, M.A. FREEMAN I L. imunização por via oral crônica de ratos de laboratório convencionais com mutans leads estreptococos, estável supressão adquirido de anticorpos salivares **Oral Microbiol. Immunol.** 7 :. 137-141, 1992.

ROBERTSON, P.B.; MACKLER, B.F.; WRIGHT, T.E.; LEVY, B. M. periodontal de pacientes com anomalias do sistema imunológico. II. . Observações durante um período de 2 anos **J. Periodontol. Res.** 51: 70-73, 1980.

ROBERTSON, P.B.; WRIGHT, T.E.; MACKLER, B.F.; LENERTZ, D.M; LEVY, B. M. Periodontal de pacientes com anomalias do sistema imunológico. **J. periodontol. Res.** 13: 37-45, 1978.

RODRIGUES-CARVALHO, C. **Patologias e processos dento-maxilares em remanescentes esqueléticos de dois sítios pré-históricos no Brasil: o cemitério da Furna do Estrago (Pernambuco) e o Sambaqui de Cabeçuda (Santa Catarina).** Tese de mestrado. Fundação Oswaldo cruz, 1997.

ROSAN, B.; EIFERT, R.; GOLUB. E. **Bacterial surfaces, salivary pellicles, and plaque formation.** In: Mergenhagen SE, Rosan B (ed). Molecular Basis of Oral Microbial Adhesion. American Society for Microbiology, Washington, p. 69-76, 1985.

ROSEBURY. **Bacterial and mycotic infections of man.** 2nd, ed. Lippincott, Phyladelphia p. 690-706, 1952.

ROWLES, S. Further studies on the crystalline constituents of oral calculus. **J. Dent. Res.** 40, 1284, 1961.

SALLES CUNHA, E. **Paleopatologia dentaria: carie.** Rio de Janeiro: Editora Científica, 1963.

SANTOS, A.A.C. **Estudos de Vibrios anaeróbicos da cavidade oral.** Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1978.

SCANNAPIECO, F.A.; LEVINE, M.J. **Saliva e películas dentais.** I: Genco R.J., Goldman H.M., Cohen D.W. Periodontia contemporânea. 3ªed. São Paulo: Santos. P.177-25, 1999.

- SCHIEE, A.A. Mechanisms of dental plaque formation. **Adv. Dent. Res.** 8: 246-253. 1994.
- SHEIHAM, A. Changing trends in dental caries. **Int. J. Epidemiol.**, v.13, n.2, 1984.
- SILLEN, A. Dietary change in the epi-paleolithic and Neolithic of the levant: the Sr/Ca evidence. **Paleorient**. Vol. 10/1. 1984
- SIMON-SORO, A.; MIRA, A. Solving the etiology of dental caries. **Trends. Microbiol.** 23(2):76-82. doi: 10.1016/j.tim.2014.10.010, 2014.
- SIMS, W. Oral haemophili 1. **Med. MicrobioL**3:61 5-25, 1970.
- SMITH, P.. Diet and attrition in the Natufians. **A. J. Phys. Anthropol.** 1972.
- SMITH, J. **Infec. Dis.**, 46, 303-310, 1930.
- SOCRANSKY, S.; MANGANIELLO, S.D. The oral microbiota from birth to senility. *J Periodont*;42:485-94, 1971.
- SREEBNY, L. M. Sugar and human dental caries. **World Rev. Nutr. Diet.**, Basel, v. 40, p. 19-65, 1982.
- STEELE, D.G., BRAMBLETT, C.A. **The anatomy and Biology of the Human Skeleton**. Eighth Printing, 2007.
- TAKAHASHI N.; NYVAD, B. Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. **Caries Res.** 42:409–418, 2008.
- TANZER, J.M. **Adoçantes e cárie: Alguns pontos emergentes**. In Bowen WH, Tabak LA, organizadores. *Cariologia para a década de 90*. São Paulo: Editora Santos; p. 383 1995.
- TAUBMAN, M.A. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology**. Mosby, St. Louis, p. 267-275, 1992.
- TENÓRIO, M.C. **Os fabricantes de machado da Ilha Grande**. In: Tenório MC (Org.). *Pré-história da terra Brasilis*. Rio de Janeiro: Ed. UFRJ;. p. 233-24, 1999.
- THYSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Tratado de cariologia**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 388p, 1988.
- TURNER II, C.G. Dental anthropological indications of agriculture among the Jomon people of central Japan. **Am. J. Phys. Anthropol.** 51: 619-36, 1979.
- WARWICK, R.; WILLIAMS, P.L. **Gray - Anatomia**. 35 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. v.1979.

WARINNER ,C.; SPELLER, C.; COLLINS, M.J. A new era in palaeomicrobiology: prospects for ancient dental calculus as a long-term record of the human oral microbiome. **Phil. Trans. R. Soc.** 2015.

WEERKAMP, A.H; QUIRYNEN, M.; MARECHAL, M.;, VAN DER MEI, H.C.; VAN STEENBERGHE, D.; BUSSCHER, H.J. The role of surface free energy on the early *in vivo* formation of dental plaque on human enamel and polymeric substrata. **Microbial. Ecol.** 2:11-18, 1989.

WEIGER, R.; NETUSCHIL, L.; VAN OHLE, C.; BRECX, M. Microbial **vitality during early dental plaque formation** (abstract). NOF/CED meeting, Kolding, Denmark, 152, 1993.

WESOLOWSKI, V.; MENDONÇA DE SOUZA, S.; REINHARD, K.; CECCATINI, G. Grânulos de amido e fitólitos em cálculos dentários humanos: contribuição ao estudo ao modo de vida e subsistências de grupos sambaquianos do litoral sul do Brasil. **Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia**, 2007.

WESOLOWSKI, V. Caries prevalence in skeletal series – Is it possible to compare? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 101(Suppl II): 139-45, 2006.

WESOLOWSKI, V. **A prática da horticultura entre os construtores de sambaquis e acampamentos litorâneos da região da Baía de São Francisco, Santa Catarina: Uma abordagem bio-antropológica.** [Dissertação de mestrado]. Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo; 2000.

WHITE, G.E. **Dental caries: a multifactorial disease.** Springfield: Charles C. Thomas Editor; 1975.

WILLIAM COSTERTON, J.; ZBIGNIEW LEWANDOWSKI; DOUGLAS, E.; CALDWELL; DARREN, R.; KORBER; HILARY, M.; LAPPIN-SCOTT. A,Ulu. **Rev. Microbial.** 49:7Jl-45, 1995.

WILSON, T.G.; KORNMAN, K.S. **Fundamentos de Periodontia;** Editora LTDA, 2001.

UCHÔA, D.P. **Arqueologia de Piaçaguera e Tenório: análise de dois tipos de sítios précerâmicos do litoral paulista** [Tese de doutorado].Rio Claro: Faculdade de Filosofia,Ciências e Letras de Rio Claro; 1973.

VANDERMEERSCH, B.; ARENSBURG, B.; TILLIER, A.M.; RAK, Y.; WEINER, S.; SPIERS, M.; ASPILLAGA, E. Middle Paleolithic dental bacteria from Kebara, Israel. **C. R. Acad. Sci.** II 319, 727– 731, 1994.

VAN HOUTE, J., GIBBONS, R. J., PULKKINEN, A. J. Oral ecology and virulence of *Lactobacillus casei* and *Streptococcus mutans* in gnotobiotic rats.. **Infect. Immun.** 6:723-29, 1972.

ZHOU, X.; LI, Y. **Atlas of oral microbiology from healthy microflora to disease**, 1ed, Academic press, 2015.

ZUCKERMAN, M.K.; TURNER, B.L.; ARMELAGOS, G.J. **Evolutionary Thought in Paleopathology and the Rise of the Biocultural Approach**. In: Grauer AL (ed.). *A Companion to Paleopathology*. 1 ed. United Kingdom. Blackwell Publishing. p. 34-57, 2012.

APÊNDICE

FICHA DE REGISTRO DENTÁRIO

I) IDENTIFICAÇÃO DO EXEMPLAR N° tombo: _____

Nome do sítio: _____

Localidade: _____

Quadra: _____ Nível: _____

II) DESCRIÇÃO DO DENTE/CÁLCULO ELEGÍVEL

Tipo de dente: Incisivo Pré-molar ☐ Molar ☐ Canino ☐

Localização: Mandíbula ☐ Maxilar ☐

Lado: Direito ☐ Esquerdo ☐

Face: Oclusal ☐ Bucal ☐ Lingual ☐

III) DESCRIÇÃO DO DENTE/CÁLCULO ELEGÍVEL

Tipo de dente: Incisivo ☐ Pré-molar ☐ Molar ☐ Canino ☐

Localização: Mandíbula ☐ Maxilar ☐

Lado: Direito ☐ Esquerdo ☐

Face: Oclusal ☐ Bucal ☐ Lingual ☐

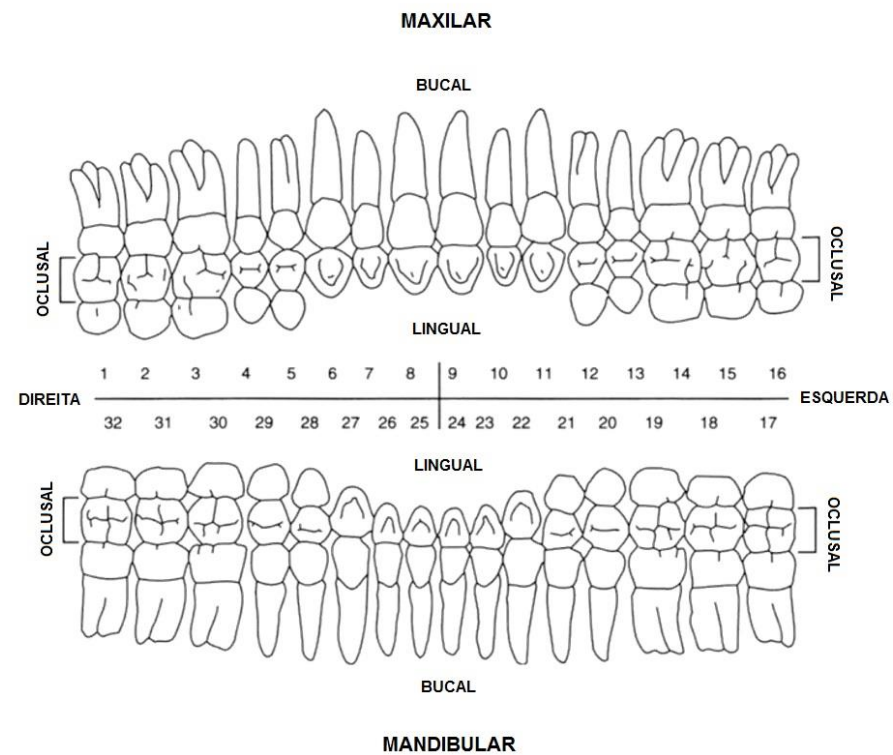
IV) REGISTRO DE FOTO

Foto macroscópica:

Foto microscopia óptica:

Foto microscopia eletrônica de varredura:

Fotografia digital:



Fonte: adaptado para português de Buikstra & Ubelaker (1994)

- ☐ Dente
- ☐ Cálculo dentário elegível

Observações: _____