

UNIVERSIDADE PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Karine Takahashi

Avaliação da microbiota bucal de mães e pares de crianças aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade e sua relação com dieta alimentar, hábitos de higiene bucal, condição gengival, erupção dentária e prevalência de cárie dentária

ARAÇATUBA - SP

2009

Karíne Takahashi

Avaliação da microbiota bucal de mães e pares de crianças aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade e sua relação com dieta alimentar, hábitos de higiene bucal, condição gengival, erupção dentária e prevalência de cárie dentária

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Araçatuba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Robson Frederico Cunha

Co-Orientador: Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Jr.

Araçatuba - SP

2009

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Takahashi, Karine

T136a Avaliação da microbiota bucal de mães e pares de crianças aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade e sua relação com dieta alimentar, **hábitos de higiene bucal, condição gengival, erupção dentária e prevalência de cárie dentária / Karine Takahashi. - Araçatuba :** [s.n.], 2009
133 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2009

Orientador: Prof. Robson Frederico Cunha

Coorientador: Prof. Elerson Gaetti Jardim Júnior

1. Saliva 2. Cárie dentária 3. Higiene bucal 4. *Streptococcus mutans* 5. Bactérias anaeróbias

Black D27

CDD 617.645

Súmula Curricular

Karíne Takahashi

NASCIMENTO:	30/10/1978 - Sales Oliveira/SP
FILIAÇÃO:	Tatuo Joaquim Takahashi Luzia Watanabe Takahashi
1996/1999:	Curso de Graduação Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
2000/2001:	Curso de Especialização em Odontopediatria, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP
2002/2003:	Curso de Especialização em Endodontia na Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP
2003/2004:	Mestrado em Odontopediatria (Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP) Avaliação da resposta tecidual às Pastas Guedes Pinto e de Hidróxido de cálcio. Análise edemogênica e ao microscópio óptico, em ratos. Orientador Prof. Dr. Eloi Dezan Júnior
2006/ 2009	Professora da Disciplina de Clínica Integrada Infantil e Clínica do Bebê do CESUMAR (Centro Universitário de Maringá)
2006/ 2009	Aluna do curso de Doutorado em Odontopediatria do Programa de Pós- Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,
Primeiramente,
A ***Deus***, acima de tudo,
e ao Mestre Soberano, amigo, ***Jesus Cristo***.

Ó Senhor Supremo de todos os mundos
E de Todos os Seres,
Recebe, Senhor,
O nosso agradecimento
De filhos devedores do teu Amor!
Dá-nos tua benção,
Ampara-nos a esperança,
Ajuda-nos o ideal
Na estrada imensa da vida...
Seja para teu coração,
Cada dia,
Nosso primeiro pensamento de amor!
Seja para tua bondade Nossa alegria de
viver!
Pai de Amor Infinito
Dá-nos tua mão generosa e santa.
Longo é o caminho,
Grande o nosso débito,
Mas inesgotável é a nossa esperança.

Pai Amado,
Somos as tuas criaturas,
Raios divinos
De Tua Divina Inteligência.
Ensina-nos a descobrir
Os tesouros imensos
Que guardaste
Nas profundezas de nossa vida,

Auxilia-nos a acender
A lâmpada sublime
Da Sublime procura!
Senhor,
Caminhamos contigo
Na eternidade!
Em Ti nos movemos para sempre.
Abençoa-nos a senda,
Indica-nos a Sagrada
Realização.
E que a glória eterna
Seja em teu eterno trono!
Resplandeça contigo a Infinita Luz,

Mane em teu coração misericordioso
A soberana fonte do amor,
Cante em tua criação infinita
O sopro divino da Eternidade.
Seja a tua benção Claridade aos nossos
olhos,
Harmonia ao nosso ouvido,
Movimento às nossas mãos,
Impulso aos nossos pés.
No amor sublime da Terra e dos Céus!
Na beleza de todas as vidas,
Na progressão de todas as coisas,
Na voz de todos os seres,
Glorificado sejas para sempre, Senhor.

Francisco Cândido Xavier

Os mensageiros

Pelo Espírito André Luís

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão de auxílio a pesquisa, que viabilizou a realização deste projeto (Processo 06/60312-2)

Àqueles que me deram força e sustentação, incondicionalmente, em todos os momentos de minha vida, faltam palavras para descrever minha eterna gratidão e meu Amor por todos vocês:

Ao meu marido, **Júnior**,

“O trigo para mim não vale nada. Os campos de trigo não me lembram coisa alguma. E isso é triste! Mas tu tens cabelos dourados. Então será maravilhoso quando tiveres me cativado. O trigo, que é dourado, fará com que eu me lembre de ti. E eu amarei o barulho do vento no trigo.”

O Pequeno Príncipe (Antoine de Saint- Exupéry)

À Família, base, sustentação e refúgio:

A meus pais, **Joaquim e Luzia**,

Às minhas irmãs, **Kátia e Aline**.

“Ainda que eu falasse línguas, as dos homens e dos anjos, se eu não tivesse o Amor, seria como sino ruidoso ou como címbalo estridente. Ainda que eu tivesse o dom da profecia, o conhecimento de todos os mistérios e de toda a ciência; ainda que eu tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tivesse o Amor, eu nada seria. Ainda que eu distribuísse todos os meus bens aos famintos, ainda que entregasse o meu corpo às chamas se não tivesse o Amor, nada disso me adiantaria. O Amor é paciente, o Amor é prestativo; não é invejoso, não se ostenta, não se incha de orgulho. Nada faz de inconveniente, não procura seu próprio interesse, não se irrita, não guarda rancor. Não se alegra com a injustiça, mas se regozija com a verdade. Tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. O Amor jamais passará. As profecias desaparecerão, as línguas cessarão, a ciência também desaparecerá. Pois o nosso conhecimento é limitado; Limitada também é a nossa profecia. Mas quando vier a perfeição, desaparecerá o que é limitado. Quando eu era criança, falava como criança, pensava como criança, raciocinava como criança. Depois que me tornei adulto, deixei o que era próprio de criança. Agora vemos como em espelho e de maneira confusa; Mas depois veremos face a face. Agora o meu conhecimento é limitado, mas depois conhecerei como sou conhecido. Agora, portanto, permanecem estas três coisas: a fé, a esperança e o Amor. A maior delas, porém, é o Amor.”

Aos amigos especiais, **Márcia, Guto, Paula, Élcio, Vera, Danielle, Júnior, Marielle, Fernanda e Eric**, e a um outro grupo, que, juntos, me deram amparo espiritual para que prosseguisse na caminhada.

“Um sonho que se sonha só, é apenas um sonho; um sonho que se sonha junto, vira realidade.”

Carlos Drummond de Andrade

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Robson Frederico Cunha**, exemplo de docência, de comportamento firme, decidido, e acima de tudo um educador, obrigado pelo apoio, entendimento e pelo exemplo que carregarei comigo em minha vida profissional e acadêmica.

“Uns são homens, alguns são professores,
poucos são mestres.

Aos primeiros, escuta-se.

Aos segundos, respeita-se.

“Aos terceiros, segue-se.”

(Raquel Eckert)

Às **crianças**, que acompanhamos seu crescimento por 2 anos, e suas **mães**, por sua amizade, paciência, dedicação e empenho, também nossa eterna gratidão...

O dia mais belo: hoje
A coisa mais fácil: errar
O maior obstáculo: o medo
O maior erro: o abandono
A raiz de todos os males: o egoísmo
A distração mais bela: o trabalho
A pior derrota: o desânimo
Os melhores professores: as crianças
A primeira necessidade: comunicar-se
O que traz a felicidade: ser útil aos demais
O pior defeito: o mau humor
A pessoa mais perigosa: a mentirosa
O pior sentimento: o rancor
O presente mais belo: o perdão
O mais imprescindível: o lar
A rota mais rápida: o caminho certo
A sensação mais agradável: a paz interior
A maior proteção efetiva: o sorriso
O maior remédio: o otimismo
A maior satisfação: o dever cumprido
A força mais potente do mundo: a fé
As pessoas mais necessárias: os pais
A mais bela de todas as coisas: O AMOR!!!

MADRE TEREZA DE CALCUTÁ

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. **Elerson Gaetti Jardim Júnior**, pela dedicação e colaboração, e principalmente pelo interesse e empenho no desenvolvimento deste trabalho.

“Nenhuma história humana é escrita sem a presença de uma ou duas mãos amigas que se estendem em nossa direção.”

Edições Paulinas

Aos **alunos**, que sem eles não haveria por que da realização deste trabalho; ao aprendizado, evolução e legado que me proporcionaram, e acima de tudo à convivência no meio estudantil, que tanto me enriquece como educadora, e acima de tudo, como pessoa.

“O professor não deve ser apenas um programador de cultura; a plenitude do mestre não é ser instrutor, mas sim, educador.”

Leoni Kassef

À colega, da qual também dependeu a execução deste e da continuação deste trabalho, **Karina Gerhardt Bianco**, peço desculpas por vezes pelos desentendimentos e sou eternamente grata pela ajuda.

À colega, **Daniela Oliveira**, agradeço pela colaboração ao fim do trabalho.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Sabino

À UNESP, como Instituição, que me abriga e me acolhe, por todos estes anos desde a minha graduação, e aqui me senti segura, mais uma etapa aqui se encerra....

Meus sinceros agradecimentos....

.... A todos os docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP;

.... A todos os docentes da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP;

... Às estagiárias da Disciplina de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP;

.... À Prof.^a Ana Cláudia Okamoto, da Disciplina de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP;

.... A todos os alunos do Curso de pós – graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP;

.... A todos os funcionários da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP;

... Ao funcionário da ADFOA, Marco, na ajuda com a formatação e impressão deste trabalho;

.... A todos os professores, principalmente ao Prof. Wagner Simm, Maria Gisette Arias Provenzano, Marina de Lourdes Calvo Fracasso, Fabrício Monteiro Machado, Emília Kobayashi, Rosely Suguino e funcionários do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR;

Por fim, a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desta pesquisa.

**“O Senhor é meu pastor, nada me faltará.
Em verdes prados, ele me faz repousar.
Conduz-me junto às águas refrescantes,
Restaura as forças de minha alma.
Pelos caminhos retos ele me leva,
Por amor do seu nome.
Ainda que eu atravesse o vale escuro,
Nada temerei, pois estais comigo.
Vosso bordão e vosso báculo são o meu amparo.
Preparais para mim a mesa à vista de meus inimigos.
Derramais o perfume sobre minha cabeça,
E transborda minha taça.
A vossa bondade e misericórdia não de seguir-me
Por todos os dias de minha vida.
“E habitarei na casa do Senhor por longos dias.”**

(Salmo 22/23)

Epígrafe

“Mas eis que sucede uma coisa extraordinária. Na mordança que desenhei para príncipezinho, esqueci de juntar a correia! Não poderá jamais prendê-la no carneiro. E eu pergunto então: "Que se terá passado no planeta? Pode bem ser que o carneiro tenha comido a flor.. . " Ora eu penso: "Certamente que não! O príncipezinho encerra a flor todas as noites na redoma de vidro e vigia bem o carneiro. . . " Então, eu me sinto feliz. E todas as estrelas riem docemente. Ora eu digo: "Uma vez ou outra a gente se distrai e basta isto! Esqueceu uma noite a redoma de vidro ou o carneiro saiu de mansinho, sem que fosse notado. Então os guizos se transformam todos em lágrimas. Eis aí um mistério bem grande. Para vocês, que amam também o príncipezinho, como para mim, todo o universo muda de sentido, se num lugar, que não sabemos onde, um carneiro, que não conhecemos, comeu ou não uma rosa... Olhem o céu. Perguntem: Terá ou não terá o carneiro comido a flor? E verão como tudo fica diferente... E nenhuma pessoa grande jamais compreenderá que isso tenha tanta importância!”

O Pequeno Príncipe
Antoine de Saint- Exupéry

Resumo

TAKAHASHI, K. Avaliação da microbiota bucal de mães e pares de crianças aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade e sua relação com dieta alimentar, hábitos de higiene bucal, condição gengival, erupção dentária e prevalência de cárie dentária. 2009. 152 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a microbiota bucal de mães, e pares de crianças, atendidas no programa educativo-preventivo da Bebê Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, nas faixas etárias de 6, 12, 18 e 24 meses, relacionando-a com a dieta, higiene bucal, presença ou não de dentes, prevalência de cárie e condição gengival. Após exame clínico e levantamento da dieta alimentar das crianças, foi realizada coleta dos espécimes de saliva, biofilme nas faixas etárias determinadas, que foram transferidos para frascos contendo meio de transporte VMGA III, submetidos a diluições seriadas em VMGA I, seguido de inoculação em meios de cultura adequados e incubação em diferentes condições redox e períodos de tempo. Além disso, a identificação dos isolados foi também realizada através de amplificação do DNA por PCR, após armazenamento dos espécimes em água ultra pura, e os níveis salivares de estreptococos do grupo mutans foram avaliados por real-time PCR. Nas faixas etárias avaliadas, não se observou correlação entre prevalência de patógenos orais e tipo de hábitos de dieta e higiene oral, sendo esta relacionada ao número de dentes irrompidos, principalmente com relação à prevalência de cocos cariogênicos e suas populações. Os microrganismos mais freqüentemente detectados aos 6 meses, pertenciam ao gênero *Actinomyces*, *Campylobacter rectus*, e à espécie *Fusobacterium nucleatum*. De maneira geral, aos 6 meses, a colonização da cavidade bucal dos bebês, por esses microrganismos, era transitória, por vezes não sendo observados em coletas subseqüentes. Aos 12 meses, observou-se uma elevação na prevalência de *Actinomyces* sp., *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus sobrinus*. Nesta faixa etária, a presença de *Eikenella corrodens* foi estatisticamente significativa. Já aos 18 meses, houve aumento significativo na prevalência de *Actinomyces* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *S. mutans* e *S. sobrinus*. Os níveis mais elevados de cocos cariogênicos foram encontrados nas crianças portadoras de cárie e dieta cariogênica. Aos 24 meses, a prevalência de microrganismos mostrou-se semelhante a encontrada aos 18 meses, com exceção de *S. mutans* e *S. sobrinus*, que tiveram sua prevalência aumentada. Houve correlação positiva entre microrganismos encontrados na mãe e em seus bebês em todos os períodos avaliados. Sendo assim, medidas educativo-preventivas, que visam o controle do biofilme bacteriano, devem abordar também atendimento odontológico às mães, uma vez que estas são as principais transmissoras de microrganismos anfibiônicos aos bebês. Além disso, o controle do biofilme bacteriano, conforme o aumento do número de dentes irrompidos nas crianças, deve ser considerado fundamental no atendimento odontológico a primeira infância, uma vez que esta correlação foi altamente positiva.

Palavras-chave: Saliva. Cárie dentária. Higiene bucal. *Streptococcus mutans*.

Bactérias anaeróbias.

Abstract

TAKAHASHI, K. Evaluation of mother's and infant's oral microflora at 6, 12, 18 and 24 months of age, and its relation with diet intake, oral hygiene habits, periodontal condition, tooth eruption and prevalence of dental caries. 2009. 152 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate oral microorganisms of 50 infants and their mothers, in the ages of 6, 12, 18 and 24 months, integrants of Baby-Clinic's preventive program (Dental School of Aracatuba- UNESP). This factor was related to diet, oral hygiene habits, presence of teeth, prevalence of caries and periodontal conditions. After clinical exam, saliva and oral biofilm were collected and stored for culture and PCR process. Salivary levels of *Streptococcus mutans* were measured by Real time PCR. In the ages of the infants examined, after statistical analysis, it could be observed that no correlation was found between presence of oral pathogens and diet and hygiene habits, otherwise, this correlation could be seen with increase of erupted teeth. Most frequent microorganisms found in oral flora of infants at six months were *Actinomyces*, *Campylobacter rectus* and *Fusobacterium nucleatum*. Microorganisms observed at one period, could not be found in the other, suggesting that it was not a resident flora. At 12 months, data revealed increase in prevalence of *Actinomyces* sp., *Fusobacterium nucleatum* e *S. sobrinus*. In this age, the presence of *Eikenella corrodens* was significant. At 18 months, significant increase in the population of *Actinomyces* sp., *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* was found. At 24 months, oral microflora was similar to the anterior but *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus*, had an increase of population. Positive correlation between microorganisms found in mouth of mother and children in all periods was observed. For this reason, educative and preventive measures, which aim control of oral biofilm, must be priority, and made associated with attendance of the infants, as mothers are main transmissive ways to their children. Besides, the control of oral biofilm, as eruption infants' teeth occurs, should be considered of great importance in Preventive Dentistry, as this correlation was highly positive.

Keywords: Saliva. Dental caries. Oral hygiene. *Streptococcus mutans*. Anaerobic bacteria.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Iniciadores utilizados nos ensaios de amplificação do DNA bacteriano.	62
Tabela 2	Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do DNA microbiano por real-time PCR.	63
Tabela 3	Ocorrência dos principais microrganismos bucais associados à cárie e doenças periodontais na saliva de crianças com 6 meses de idade e suas mães. Resultados obtidos por cultura.	71
Tabela 4	Ocorrência dos principais microrganismos bucais associados à cárie e doenças periodontais na saliva de crianças com 6 meses de idade e suas mães. Resultados obtidos por PCR.	72
Tabela 5	Ocorrência dos principais microrganismos bucais associados à cárie e doenças periodontais no biofilme das mães (N=50). Resultados obtidos por cultura e PCR.	73
Tabela 6	Variação de dentes erupcionados nas crianças avaliadas aos 12 meses de idade.	74
Tabela 7	Ocorrência dos principais microrganismos bucais associados à cárie e doenças periodontais na saliva de crianças com 12 meses de idade e suas mães.	76
Tabela 8	Ocorrência dos principais microrganismos bucais associados à cárie e doenças periodontais no biofilme de crianças com 12 meses de idade e suas mães.	77
Tabela 9	Variação de dentes erupcionados nas crianças avaliadas aos 18 meses de idade.	78
Tabela 10	Ocorrência dos principais microrganismos bucais associados à cárie e doenças periodontais na saliva de crianças com 18 meses de idade e suas mães.	82
Tabela 11	Ocorrência dos principais microrganismos bucais associados à cárie e doenças periodontais no biofilme de crianças com 18 meses de idade e suas mães.	83
Tabela 12	Variação no número de dentes erupcionados nas crianças avaliadas aos 24 meses de idade.	84
Tabela 13	Ocorrência dos principais microrganismos bucais associados à cárie e doenças periodontais na saliva de crianças com 24 meses de idade e suas mães.	88

Tabela 14

Ocorrência dos principais microrganismos bucais associados à cárie e doenças periodontais no biofilme de crianças com 24 meses de idade e suas mães.

89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Número e porcentagem de bebês avaliados aos 6 meses de idade, que realizavam higienização bucal.	68
Gráfico 2	Número e porcentagem de bebês avaliados aos 6 meses de idade, quanto ao tipo de aleitamento.	69
Gráfico 3	Número e porcentagem de bebês aos 6 meses de idade, quanto ao tipo de aleitamento noturno.	70
Gráfico 4	Número e porcentagem de bebês avaliados aos 12 meses de idade, com relação a freqüência de higienização bucal.	75
Gráfico 5	Número e porcentagem de bebês avaliados aos 18 meses de idade, com relação a freqüência de higienização bucal.	79
Gráfico 6	Número e porcentagem de bebês avaliados aos 18 meses de idade, com relação ao padrão de consumo de alimentos açucarados.	80
Gráfico 7	Número e porcentagem de bebês avaliados aos 18 meses de idade, quanto a prevalência de lesão de cárie dentária.	81
Gráfico 8	Número e porcentagem de crianças avaliadas aos 24 meses de idade, relacionadas com o número de vezes que realizavam a higiene bucal.	85
Gráfico 9	Número e porcentagem de crianças avaliadas aos 24 meses de idade, com relação ao padrão de consumo de alimentos açucarados.	85
Gráfico 10	Número e porcentagem de crianças avaliadas aos 24 meses de idade, relacionadas com a prevalência de lesão de cárie dentária.	86

LISTA DE ANEXOS

Anexo A -	Ofício aprovação Comitê de Ética em Pesquisa	147
Anexo B -	Condição bucal das crianças aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade	148
Anexo C -	Padrão de consumo de alimentos açucarados dos pacientes avaliados aos 12, 18 e 24 meses de idade	151

SUMÁRIO

1 Introdução	28
2 Revisão da Literatura	34
3 Proposição	55
4 Material e Métodos	57
5 Resultados	67
6 Discussão	93
7 Conclusão	120
8 Referências	122
9 Anexos	147

Introdução

1 *Introdução*

O conceito de que a assistência odontológica à criança deve atuar juntamente com os pais está bem estabelecido, promovendo-se consultas sucessivas, além de um relacionamento positivo com o profissional, perdurando até a idade adulta. Assim, a odontologia para bebês firma-se como tendência na odontologia atual, sendo sua filosofia baseada principalmente em práticas educativas e preventivas, ainda nos primeiros meses de vida, com ações direcionadas para a determinação dos fatores de risco para as diferentes patologias bucais (CUNHA et al., 2000).

Por tratar-se a primeira infância como a fase mais importante para o estabelecimento da saúde bucal futura do indivíduo, em função da erupção dos dentes decíduos, desenvolvimento da microbiota bucal e pelo estabelecimento de hábitos de saúde bucal (FRISSE et al., 1998), é necessária a realização de estudos que avaliem a relevância desses fatores nas condições de saúde bucal da criança, pois carecemos de informações significativas sobre crianças nesta faixa etária, bem como a forma com que cada um desses fatores interagem entre si nessa idade, o que contrasta com a abundância de dados relativos a faixas etárias de pré-escolares e escolares (CARIÑO et al., 2003).

Estudos realizados nas décadas de 1970 e 1980 estabeleceram a importância das populações de cocos cariogênicos na atividade e risco à cárie de crianças, enquanto Caulfield et al. (1993), estenderam os princípios da janela de infectividade para a transmissão e estabelecimento da microbiota cariogênica em crianças. Os diferentes aspectos que norteiam a janela de infectividade para os cocos cariogênicos também são válidos para os demais microrganismos bucais, sendo que representam uma associação de condições biológicas, microbianas e ambientais.

Dentre os fatores ambientais destacam-se os ligados à dieta alimentar, características socioeconômicas e culturais da população, bem como as condições sanitárias e de saúde bucal da população (CAUFIELD et al., 1993; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005).

Há muitas evidências da participação de espécies bacterianas acidogênicas, como *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus* e lactobacilos no desenvolvimento da cárie dentária, bem como de microrganismos anaeróbios obrigatórios e microaerófilos nas diferentes modalidades de doenças periodontais, embora a incorporação destes microrganismos a uma microbiota em constante transformação, em crianças com pouca idade, ainda não tenha sido adequadamente descrita. Além desse aspecto, a ocorrência de alguns microrganismos bucais sofre notável influência étnico-racial na sua distribuição geográfica (HAFFAJEE et al., 2004) e não são conhecidos os efeitos das particularidades da população brasileira, que apresenta ampla miscigenação e aspectos culturais únicos, sobre a distribuição desses microrganismos em crianças com até 18 meses de idade, além da influência de programas educativo-preventivos sobre esse fenômeno.

O fato de que a cárie dentária em animais é uma doença infecciosa e transmissível foi primeiramente demonstrada por Keyes em 1960. Desde então, um grupo de bactérias fenotipicamente similares, conhecidas como *S. mutans*, foram determinadas como principais componentes bacterianos responsáveis pela cárie em humanos. Bebês são colonizados por estas bactérias somente após a erupção dentária, uma vez que *S. mutans* necessita da presença de uma superfície dura e não descamável para sua colonização (CAUFIELD et al., 1993). A colonização precoce por *S. mutans* é um grande fator de risco para o estabelecimento da cárie precoce da infância e futuras experiências de cárie dentária (TANKKUNNASOMBUT et al., 2009).

A lesão de cárie dentária ocorreria como resultado do desequilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização do esmalte dentário, decorrente da ação de ácidos orgânicos provenientes da fermentação microbiana de substratos alimentares locais (ALVES et al., 1998).

Por um ponto de vista etiológico, o consumo de açúcar é um dos fatores de risco mais importantes que levam ao desenvolvimento de lesões cariosas (BRAMBILLA et al., 2000). Dentre os fatores predisponentes encontram-se o uso inadequado e prolongado do leite materno (MATEE et al., 1992), ou de mamadeiras

contendo líquidos e açucarados, alimentos achocolatados, chás e sucos de frutas (RIPA, 1988; PINTO, 2003), e a deficiência de higiene bucal, particularmente no primeiro ano de vida (FRAIZ; WALTER, 2001). A cárie dentária em bebês pode se manifestar de forma agressiva, acarretando até mesmo a destruição completa do elemento dentário num curto espaço de tempo, da qual a cárie precoce da infância é exemplo característico para esta faixa etária. (RIPA, 1988).

O rápido avanço dos estudos a respeito da cárie dentária nas últimas décadas, somado ao surgimento das clínicas de assistência odontológica para bebês, provocaram redução na sua prevalência e severidade, mas ainda não foram suficientes para satisfazer os desafios existentes na primeira infância. Dessa forma, trabalhos laboratoriais e clínicos abordando os fatores envolvidos no processo dinâmico da cárie dentária sempre devem ser estimulados.

As doenças periodontais estão entre as principais causas da perda precoce de elementos dentais em adultos, mas a microbiota a elas associada se estabelece ao longo do tempo na primeira infância. A manifestação mais comum dessas doenças, em crianças e adolescentes, é a gengivite (ALBANDAR; TINOCO, 2002), sendo que a reação inflamatória observada geralmente é dependente do acúmulo de biofilme microbiano e da agressão bacteriana ao hospedeiro. Na maioria das crianças, o processo pode se iniciar em idade precoce e permanece superficial. Entretanto, se rompido o equilíbrio entre agressão microbiana e a resposta do hospedeiro, pode se também ter o envolvimento do osso alveolar, resultando na perda de inserção conjuntiva (SAKAI et al., 2007).

Como parte da microbiota normal da cavidade bucal, há uma grande variedade de microrganismos com diferentes potenciais de virulência (ALBANDAR; RAMS, 2002). Dentre esses grupos microbianos, algumas espécies bacterianas, Gram-negativas, anaeróbias obrigatórias ou facultativas, podem ter papel importante na patogênese das periodontopatias (ALBANDAR; RAMS, 2002), destacando-se *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens* e *Treponema denticola* (FENG; WEINBERG, 2006; HARASZTHY et al., 2002; MIURA et al., 2005; YANG et al., 2005; YILDIRIN et al., 2006).

Porphyromonas gingivalis é considerada como maior patógeno relacionado à periodontite no adulto, e é ocasionalmente detectada em amostras da cavidade bucal em crianças (LAMELL et al., 2000). Além disso, *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans tem sido associado à periodontites agressivas e foi detectado em amostras de biofilme dental de crianças (ALALUUSUA; ASIKAINEN, 1988; DARBY; CURTIS, 2001). Por outro lado, *Treponema denticola*, *Capnocytophaga ochracea*, *C. sputigena*, *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus* e *Eikenella corrodens* têm sido associados a doenças periodontais (BOTERO et al., 2007; CARVALHO et al., 2009; CORTELLI et al., 2008; ; HAFFAJEE et al., 2006; MARTÍNEZ-PABÓN et al., 2008; MIYAMOTO et al., 2009; OOSHIMA et al., 2003) e sua distribuição em crianças necessita ser melhor avaliada, tanto quanto seu real papel das doenças periodontais em populações sul americanas, as quais possuem numerosas peculiaridades culturais, de dieta e genéticas não sendo encontradas em outros locais do mundo.

Como e quando estes microrganismos, citados acima, colonizam a cavidade bucal durante a infância, permanecem como perguntas incertas na literatura. Estudos da distribuição de periodontopatógenos entre membros da mesma família podem ser úteis para esclarecer estas questões e prever o futuro estabelecimento e progressão das doenças periodontais (UMEDA et al., 2004).

Estudos entre pares de mães e crianças sugerem transmissão vertical de *S. mutans* nas populações humanas (CAUFIELD et al., 1993). Crianças, cujas mães possuem altas concentrações salivares de *S. mutans*, adquirem estas precocemente e em número mais alto, quando comparadas a crianças provenientes de mães que apresentam baixos níveis (BRAMBILLA et al., 1998). Periodontopatógenos também podem ser transmitidos pelos pais, principalmente pelas mães, durante a infância (DOGAN et al., 2008; KONONEN et al., 2000; WATSON et al., 1991, 1994).

Sabe-se que, as poucas crianças colonizadas por patógenos periodontais freqüentemente não manifestam sinais de doença periodontal, e que há correlação com colonização e doença periodontal nas mães (KIMURA et al., 2002; YANG et al., 2002).

Os métodos de diagnóstico molecular representam uma importante ferramenta na identificação das espécies microbianas bucais (OHO et al., 2000; SAYGUN et al., 2005; SUZUKI et al., 2004), colaborando na compreensão das inter-relações entre essa microbiota e seu hospedeiro, além de permitir uma identificação mais específica e precisa dessas bactérias (YAMAURA et al., 2005). Nesse sentido, a literatura menciona a utilização de métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para a identificação dessas espécies (SANZ et al., 2004; SUZUKI

et al., 2004; YILDIRIN et al., 2006). Contudo, a aplicação dessas metodologias, em nosso país, ainda é escassa, principalmente, para a identificação de espécies anaeróbias bucais.

Considerando todos os fatores que podem estar envolvidos no processo de iniciação da lesão de cárie dentária e doença gengival na primeira infância, bem como a participação das mães neste processo, entendemos que estudos longitudinais relacionados ao desenvolvimento da cárie em crianças são escassos na literatura científica. Ressaltando que existe grande quantidade daqueles relacionados a escolares e pré-escolares correlacionando fatores clínicos.

Revisão da Literatura

2 Revisão Da Literatura

A Alaluusua e Malmivirta (1994) avaliaram noventa e duas crianças de 19 meses de idade, e suas mães, com relação ao risco à cárie dentária, identificando os seguintes fatores de risco: placa visível na superfície vestibular dos incisivos superiores, uso de mamadeiras, prevalência de cárie nas mães e níveis salivares maternos de *S. mutans*, utilizando teste comercial (Dentocult SM test, Orion Diagnostica, Estopoo, 4). As crianças foram examinadas aos 7, 19 e 36 meses de idade. Na primeira consulta, as mães receberam orientações relacionadas à dieta, aleitamento materno ou por mamadeira, higiene bucal e suplementação com flúor. Na segunda e terceira consulta, as mesmas orientações foram reforçadas, além de ter sido realizado exame clínico, avaliação da presença de placa visível nos incisivos superiores, e persistência de aleitamento artificial. Os níveis salivares de *S. mutans* encontrados nas mães foram baixos em 40% delas, moderados em 31% e altos em 29%. Aos sete meses de idade, nenhuma das crianças apresentou lesão de cárie. Porém, aos 19 meses, seis crianças apresentavam superfícies desmineralizadas nos incisivos superiores (8%). Aos 36 meses, 14 % das crianças (13) apresentavam lesões cariosas. Com relação aos hábitos alimentares, 33% das crianças ainda eram amamentadas aos 19 meses de idade e, com relação à presença de placa, 18% das crianças apresentavam acúmulo na face vestibular dos incisivos superiores. Segundo os autores, a presença de placa visível e o hábito persistente de aleitamento estão altamente associados ao desenvolvimento da cárie dentária, enquanto que as outras variáveis estudadas apresentaram pouca correlação.

Kalsbeek e Verrips (1994) avaliaram a relação entre consumo de aperitivos açucarados e a prevalência de cárie, em crianças de 5, 8 e 11 anos de idade, através de exame clínico das condições intrabucais e aplicação de questionário relacionado aos hábitos alimentares. A grande maioria das crianças avaliadas ingere aperitivos açucarados de uma a cinco vezes ao dia, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as idades avaliadas. As crianças de 5 anos de idade que ingeriam estes alimentos cinco vezes ao dia apresentavam índices de

cárie superiores. Já as crianças de 8 anos de idade, que ingeriam menos alimentos açucarados, apresentavam níveis menores de cárie.

Rosa (1994) afirma a necessidade de se avaliar as contagens salivares de *S. mutans*, principais bactérias causadoras da cárie dentária, através de testes específicos, que devem ser realizados nas mães e também nas babás de crianças, para, assim, determinação dos fatores de risco a cárie dentária.

Watson et al. (1994) avaliaram a presença de *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis* através de teste BANA em cento e cinquenta e sete crianças cujos pais apresentavam problemas periodontais. As crianças cujos pais foram colonizados por espécies BANA-positivas foram 9,8 vezes mais susceptíveis a colonização por estes microrganismos. Além disso, as crianças cujos pais apresentavam sinais clínicos de periodontite foram doze vezes mais sensíveis a colonização.

Weinstein et al. (1994) avaliaram cento e trinta e três crianças na faixa etária de 12 a 24 meses de idade e mães, juntamente com babás. Após entrevista e realização de exame clínico para constatação da presença de lesões cariosas em forma de mancha branca, foi aplicado verniz fluoretado nos incisivos superiores, que foi repetida após 6 meses. Os resultados demonstraram que a taxa de dentes afetados foi de 33% a 39% nos acompanhamentos. Dos 130 dentes avaliados, 13% estavam cariados ou descalcificados aos 6 meses. Dos 73 dentes descalcificados, 51% estavam hígidos a sondagem aos 6 meses.

Bijella et al. (1995) tiveram como objetivo realizar um estudo epidemiológico, em saúde bucal, junto a um grupo populacional de 375 crianças na faixa etária de 0 a 6 anos, localizadas em instituições do município de Bauru – SP, avaliando a relação existente entre a prevalência de cárie, doença periodontal e má-oclusão com os fatores sócio-econômico-culturais. As crianças foram avaliadas através de exames clínicos em que foram levantados os índices ceo, relativo à presença de cárie, e PMA, relativo à condição gengival. Através da análise dos dados, pode-se observar que o índice ceo-s na amostra foi de 15,31 e que com relação ao índice PMA, 277 crianças não apresentavam problemas gengivais (73,86%).

Kaste e Gift (1995) analisaram informações relacionadas a hábitos inadequados de aleitamento através do NHIS do ano de 1991 (National Health Interview Survey Child Health Supplement). Foram avaliadas as crianças na faixa etária de 6 meses a 5 anos de idade. Após a análise dos formulários, verificou-se

que 95% das crianças avaliadas já haviam utilizado mamadeira, sendo que aproximadamente 60% dormiam mamando, e 8% ainda faziam uso de mamadeira até o momento da entrevista. Os fatores que influenciaram na prática deste costume foram: nível educacional familiar, visitas rotineiras ao dentista, raça e região geográfica avaliada. Os autores concluíram que a alta prevalência do uso de mamadeira requer atenção especial de médicos pediatras e outros profissionais da saúde.

Roeters et al. (1995) avaliaram a aquisição de *S. mutans* e lactobacilos em 252 crianças de 2 a 5 anos de idade, correlacionando com a ocorrência destes microrganismos nas mães e consumo de alimentos açucarados. Por três anos consecutivos as crianças foram examinadas clinicamente com intervalos de seis meses, juntamente com a coleta de saliva e placa bacteriana, e o levantamento da dieta alimentar, que foi realizado pelo método recordatório das últimas 24 horas. Na primeira avaliação, *S. mutans* foi detectado em 43% das crianças enquanto que a frequência de lactobacilos foi baixa (11,5%). Em níveis individuais, número de unidades de colônias formadoras de *S. mutans* e lactobacilos na placa e saliva variaram largamente durante o período estudado. Foi encontrada baixa correlação entre os níveis salivares de bactérias encontrados nas mães e ingestão de açúcares. Nas crianças maiores de 2,5 anos, correlações entre escores clínicos de cárie e presença de lactobacilos e *S. mutans* na saliva e placa foram altamente significantes.

Mattos- Graner et al. (1996) verificaram a prevalência de cárie em 322 bebês de 6 a 36 meses de idade da cidade de Piracicaba, São Paulo, Brasil, pertencentes a famílias de classe social baixa. Das crianças examinadas, 65,2% eram livres de cárie. Já nas crianças afetadas (11,2 e 23,6%), os dentes mais envolvidos foram os posteriores primeiramente (81,5%), enquanto que os incisivos e caninos estavam envolvidos inicialmente em 65%. A idade inicial para manifestação da cárie dentária foi de 6 a 12 meses de idade. Os autores puderam concluir que a identificação precoce de fatores de risco é essencial, uma vez que 17 % das crianças afetadas mostraram 46% por cento das lesões totais de cárie.

Bonecker et al. (1997) avaliaram 548 crianças do município de Diadema-SP, na faixa etária de 0 a 30 meses para determinação da prevalência de cárie dentária, através do índice ceo-d e ceo-s. Foram realizados exames clínicos por 13 cirurgiões-dentistas, utilizando cadeira odontológica, refletor, seringa tríplice, espelho bucal e

gazes. Os índices ceo-d e ceo-s encontrados foram, respectivamente, 0,16 e 0,17 para crianças de um ano de idade, 0,87 e 1,13 para as de dois anos e 2,54 e 3,68 para as crianças de três anos. Os resultados obtidos, segundo o autor, indicam a necessidade de que a primeira visita do paciente infantil ao consultório odontológico ocorra antes do primeiro ano de vida.

Garcia-Closas (1997) analisaram a associação entre prevalência de cárie, frequência do consumo de diferentes grupos de alimentos, incluindo alimentos ricos em açúcares e amido, além da contagem microbiana de *S. mutans*. Foram avaliadas crianças na faixa etária de 6 a 15 anos de idade, em que primeiramente foi preenchido questionário de frequência alimentar com envolvimento dos pais e uma nutricionista. Os alimentos foram divididos em grupos de maior ingestão de açúcares e amidos e também relativo à sua cariogenicidade. Além disso, o questionário ainda envolvia informações relacionadas a hábitos de higiene bucal, uso de suplementação de flúor, tipo de creme dental e número de visitas ao dentista. Procederam-se ainda ao exame clínico intrabucal e coleta de saliva não-estimulada. Não foi encontrada associação significativa entre nenhum dos grupos alimentares avaliados e cárie dentária, uma vez que a prevalência de cárie na população estudada foi baixa. A associação entre consumo de alimentos açucarados e cárie pareceu ser modificada pela contagem de *S. mutans*. Estes resultados sugerem que a alta ingestão de alimentos açucarados pode ser determinante na prevalência de cárie nas crianças com contagens salivares de *S. mutans* de nível moderado a alto.

Alves et al. (1998) coletaram dados sobre hábitos dietéticos e de higiene bucal em crianças de 0 a 30 meses de idade na cidade de Recife-PE, avaliando 250 mães através de questionários. Com relação à dieta alimentar, o aleitamento materno exclusivo predominou na faixa etária de 0 a 6 meses, sendo que a partir da idade predominava a aleitamento artificial contendo açúcar, e até mesmo a introdução de outros alimentos. No que diz respeito à higiene bucal, verificou-se que o tipo de limpeza foi o mais precocemente instalado, de 0 a 6 meses, seu uso foi diminuindo com o passar da idade e introduzido principalmente devido a histórico de lesões fúngicas. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a frequência de utilização de mamadeiras açucaradas como complemento da alimentação foi alta; o aleitamento materno foi suspenso por volta dos três meses de idade; o consumo de açúcar adicionado a chás, sucos e mamadeiras foi elevado e a quantidade

aumentou a cada faixa etária; os medicamentos açucarados foram utilizados com alta frequência; e a instituição de procedimentos de higiene bucal foi tardia.

Foram obtidas amostras de placa bacteriana oclusal e bucal de vinte e cinco crianças suecas de três anos de idade, suas mães e dezoito pais. O nível de colonização por *S. mutans* foi estimado pelo teste “strip mutans”. Nas onze famílias com isolados das bactérias, foi realizada sorotipagem pela técnica de imunofluorescência e genotipagem utilizando endonuclease de restrição HaeIII. Os resultados mostraram que cinco crianças tinham *S. mutans* diferentes de seus pais. Seis crianças apresentaram genótipos idênticos aos das mães e nenhuma criança apresentou genótipo similar ao do pai apesar de 2/3 dos pais terem níveis altos ou muito altos de *S. mutans*. Nenhuma coincidência de genótipo foi observada entre os casais. Segundo o autor, a criança adquire *S. mutans* tanto dentro quanto fora da família (EMANUELSSON et al., 1998).

Frisso et al. (1998) analisaram a prática e os hábitos alimentares em sessenta crianças de 6 a 36 meses de idade, levando em consideração a ocorrência de cárie e variáveis sócio-econômicas e culturais. A pesquisa envolveu a realização de exame clínico intra-oral sob iluminação natural, com espátula e espelho clínico, e preenchimento de questionário pelas mães. Na amostra estudada verificou-se que 35% das crianças apresentavam lesão de cárie, e que 30% ainda faziam uso de aleitamento, na maioria, três vezes ao dia. Pode-se verificar que a introdução da alimentação mista iniciou-se ao 5º ou 6º mês. Ficou constatado que 50% das crianças faziam uso de mamadeira, geralmente com açúcar ou achocolatado. Não foi demonstrada associação estatisticamente significativa entre aleitamento natural e a prevalência de cárie, porém, constatou-se associação entre a preferência das crianças por doces e a prevalência de cárie.

Kononen et al. (1999) avaliaram 329 bebês finlandeses, aos 2, 6 e 12 meses de idade, através de cultura realizada por meio de coleta de saliva não-estimulada. Foram encontradas bactérias anaeróbicas em 35 (80%) dos bebês aos dois meses, em 41 (93%) aos seis meses e em todos aos doze meses de idade. *Veillonella* ssp. foi o microrganismo anaeróbico obrigatório mais freqüente aos dois meses, enquanto que *Fusobacterium nucleatum* foi o mais comum aos doze meses de idade. A análise deste estudo longitudinal pode indicar que a presença de anaeróbios obrigatórios na cavidade bucal de bebês, mesmo edêntulos, não é

somente evento casual, além disso, a colonização por anaeróbios orais é um processo seletivo com relação à idade.

Packer et al. (1999) determinaram os fatores relacionados à transmissão de infecções pelos *S. mutans*, dentre eles, quais são as pessoas que estão em maior contato com crianças na idade de 2 a 6 anos de idade e a correlação dos níveis salivares de *S. mutans* das crianças e seus responsáveis. Foram coletadas amostras salivares de cinquenta crianças e seus responsáveis, que sofreram posterior cultivo microbiano. Os resultados evidenciaram, segundo os autores, que são as mães as pessoas que ficam mais tempo com suas crianças e que existe uma similaridade bastante alta (73%) entre os níveis de *S. mutans* na saliva dos responsáveis e suas respectivas crianças.

Abreu et al. (2000) avaliaram a relação entre *S. mutans* e o desenvolvimento de cárie dentária. Para tanto, avaliaram 335 crianças de 7 a 14 anos de idade, em que realizaram contagem de *S. mutans* por técnica de aderência, e verificaram a prevalência de cárie dentária no período de um e dois anos. Os resultados mostraram que as crianças com altos níveis de infecção tiveram no período de um ano, 60% de afecção por cárie, e uma prevalência de 1,3. Já dois anos depois, as crianças com altos níveis de infecção tiveram 83,5% de afecção por cárie, e uma prevalência de 2,9, relatando que as crianças com maior infecção por esta bactéria tendem a desenvolver lesões cariosas.

Cleaton-Jones et al. (2000) realizaram estudo longitudinal de dezessete anos, avaliando padrão de cárie na dentição decídua em 6843 pré-escolares, de 2 a 5 anos de idade, na África do Sul. Foram realizados exames clínicos no ano de 1981, repetidos a cada dois anos, até 1991, depois em 1994 e 1997. Em geral, houve acréscimo na prevalência de cárie de 1981 com um pico em 1989, em que a taxa sofreu considerável decréscimo.

Dini et al. (2000) investigaram a relação entre fatores sócio-demográficos, hábitos alimentares de bebês, higiene bucal, e a prevalência, severidade e padrão de cárie dentária em crianças de 3-4 anos de idade da cidade de Araraquara, SP, Brasil. Foram realizados exames clínicos nas crianças nas escolas, e aplicação de questionário relacionado aos hábitos de higiene e dieta alimentar às mães. Foram avaliadas 245 crianças, das quais 112 (46%) apresentavam lesões cariosas. A cárie rampante foi verificada em 19 (8%) das crianças e 56 (23%) mostraram evidências clínicas de envolvimento cariioso nos incisivos decíduos. Com relação ao nível

educacional das mães, 127 (52%) eram analfabetos ou havia estudo por menos de 4 anos, 95 (39%) haviam estudado de 5 a 7 anos, 23 (9%) havia freqüentado a escola por mais de 8 anos. Classe social, nível educacional das mães, e idade do término do aleitamento materno mostraram associação estatística significativa com a prevalência de cárie.

Kamma et al. (2000) avaliaram a dentição decídua de quarenta crianças de 4 a 5 anos de idade, em que foi avaliada através de cultura, a microbiota subgengival de incisivos, caninos e molares, pela coleta da placa dental com cones de papel. Estes autores afirmaram ter encontrado grande diversidade bacteriana, aproximadamente 41 espécimes diferentes, dentre estas as mais prevalentes foram *Streptococcus sanguis*.

Lopez et al. (2000) avaliaram sessenta bebês porto-riquenhos na faixa etária de 15 meses de idade. Foram coletadas amostras de placa dental dos incisivos superiores e saliva, que foram processadas para análise microbiológica. Dos bebês avaliados, 85% (51 bebês) apresentavam *S. mutans* em pelo menos uma das duas amostras. Os autores afirmaram que bebês na faixa etária de 16 a 18 meses têm maior probabilidade de serem colonizados por *S. mutans* enquanto que os de 12 a 15 meses.

Milgrom et al. (2000) estabeleceram a prevalência de cárie dentária em crianças de 6 a 36 meses de idade, que não tinham acesso a água fluoretada, descrevendo a relação entre cárie, infecção por *S. mutans*, hipoplasia, hábitos de higiene bucal, dieta e fatores comportamentais. A prevalência de cárie foi considerada alta: 46,8% das crianças acometidas por lesões de cárie de esmalte sem cavitação e 39,1% com cavidades circunscritas ao esmalte. A colonização por *S. mutans* foi detectada em 25% das crianças edêntulas. As análises estatísticas puderam determinar que, na população estudada, hipoplasia, dieta e colonização bacteriana tiveram papel importante na etiologia da cárie.

Morinushi et al. (2000) avaliaram quarenta crianças de 2 a 18 anos de idade, através de amostras de placa analisadas por níveis séricos de anticorpos determinados por Elisa, para verificar a ocorrência de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*. Os resultados obtidos foram que 75% das crianças apresentaram índices consideráveis de colonização por *A. actinomycetemcomitans*, tendo correlação com a idade apenas aos 12 anos. *A. actinomycetemcomitans* e *P.*

gingivalis podem ser encontrados em crianças menores de três anos de idade, e estão associadas a gengivite agressiva.

Barros et al. (2001) determinaram a prevalência de cárie e sua associação com condições de higiene bucal, alimentação e uso de fluoretos em 340 crianças de 0 a 30 meses de idade de creches da Secretaria do Trabalho e Ação Social do Governo do Estado da Bahia, através de aplicação de exames clínicos e questionários. Os exames clínicos foram realizados em maca, com luz branca, auxílio de espelho e sonda exploradora, para determinação do índice ceo-d e a severidade das lesões presentes. A higiene bucal foi classificada em escores de acordo com a quantidade de biofilme dentário visível, conforme cobria a superfície do dente. Observou-se uma prevalência de cárie de 55,3% quando todos os estágios da lesão foram considerados: 25% entre 0 a 12 meses, 51,18% entre 13 a 24 meses, 71,03% entre 25 a 30 meses. Avaliando apenas manchas brancas ativas, 49,7% das crianças mostraram-se afetadas e 17,6% apenas com lesões cavitadas. Das afetadas, 90,96% apresentavam apenas dentes anteriores afetados. O aumento da quantidade de biofilme mostrou associação positiva com a cárie, e a porcentagem de crianças afetadas mostrou-se maior na presença de aleitamento noturno. Foi observado um aumento da prevalência de cárie com a idade e com o número de dentes irrompidos.

Valle et al. (2001) estabeleceram correlação entre consumo de sacarose, aleitamento natural e artificial, produtos utilizados para adoçar alimentos, frequência e tipo de aleitamento consumido entre as refeições, consumo de refrigerantes e ocorrência de doença cárie em pacientes de 0 a 36 meses de idade na Clínica de Bebês da disciplina de Odontopediatria de uma instituição pública de ensino. A amostra foi composta de cem crianças de ambos os sexos, em que foi feita entrevista com os pais ou responsáveis, com relação a dieta alimentar, e para a determinação da prevalência de cárie, foram coletadas as informações contidas nos prontuários odontológicos. Verificou-se que vinte e cinco das crianças avaliadas ainda faziam uso de aleitamento natural, enquanto que 88% tinham aleitamento artificial. A maioria das crianças fazia uso de alimentos do tipo cariogênico (94%), pastoso cariogênico (78%) e sólido cariogênico (90%). Ainda pode-se verificar que 40% das crianças apresentava lesões de cárie. Com base na avaliação dos dados obtidos, pode-se constatar que: não houve correlação entre aleitamento natural e artificial e prevalência de cárie, e houve associação significativa entre prevalência de

doença cárie e consumo de refrigerantes, alimentos sólidos cariogênicos e consumo de sacarose.

Fraiz e Walter (2001) estudaram os fatores associados com o desenvolvimento de cárie dentária em pré-escolares que receberam atenção odontológica constante, em ações educativas e preventivas. Foram avaliadas duzentas crianças de 24 a 48 meses de idade, participantes da Bebê- Clínica da UEL (Universidade Estadual de Londrina). Foi aplicado questionário às mães e exame clínico nas crianças para verificação de cárie e presença de placa visível. A presença de placa visível nos incisivos superiores esteve fortemente associada com a presença de cárie. Os fatores relacionados a presença de placa visível na superfície vestibular dos incisivos foram a educação formal materna e paterna, pais não casados, alto consumo de açúcar, presença de cárie, baixa frequência de higiene bucal, ausência de uso de dentífrico e comportamento difícil durante a higienização bucal domiciliar. Os autores puderam concluir que o padrão dietético continua sendo o principal responsável pelo desenvolvimento de lesões de cárie, sendo que a presença de placa bacteriana visível na superfície vestibular dos incisivos superiores deve ser considerada sinal clínico importante.

Ismail e Sohn (2001) investigaram a associação entre condições sócio-econômicas e a severidade da cárie em crianças de 6 a 7 anos de idade, que tiveram acesso a tratamento odontológico desde o nascimento. Foram examinadas 955 crianças, após o preenchimento de questionários pelos responsáveis. Das crianças examinadas, somente 8,4% tiveram sua primeira visita ao dentista agendada antes dos dois anos de idade, sendo que 88,5% das crianças tiveram sua primeira visita entre dois a cinco anos de idade. As crianças, cujos pais apresentavam nível educacional e sócio-econômico melhor, tinham menor número de dentes afetados por cárie.

Karjalainen et al. (2001) estudaram a relação entre ingestão diária de açúcares e a prevalência baixa de cárie, associada a higiene bucal e nível educacional dos responsáveis, em crianças de 3 a 6 anos de idade. Foram realizados exames clínicos e avaliação do índice de higiene bucal aos 37,4 meses e novamente aos 73,7 meses. Nas duas ocasiões, os pais foram entrevistados com relação ao consumo de açúcares e hábitos de higiene. Nos períodos avaliados, a proporção de crianças com experiência de cárie aumentou de 16 para 40%. O nível de ingestão de açúcares nas crianças que desenvolveram cárie aos seis anos de

idade, foi maior aos três anos, do que as crianças livres de cárie. Os autores puderam concluir que a combinação da ingestão de açúcares mais que uma vez por semana e a presença de placa visível aos três anos de idade, pode predispor a cárie três anos depois.

Pimenta et al. (2001) avaliaram três gerações brasileiras (93 indivíduos de seis famílias), com coleta de saliva não-estimulada. As colônias características foram contadas, re-inoculadas e biotipadas, sendo o *S. mutans* isolado em 86% dos indivíduos. As contagens na saliva variaram de 3×10^2 a $1,6 \times 10^8$ UFC/mL de saliva. Todos os adultos estavam colonizados. Apenas em 35% das crianças a bactéria foi detectada, sendo 63,7% eram monocolonizadas. Devido a alta prevalência do *S. mutans* na saliva dos membros da família, sugeriu-se o risco de transmissão intrafamiliar.

Gripp e Schlagenhaut (2002) avaliaram a influência de verniz de clorexidina na supressão de *S. mutans* em quarenta e quatro mães com contagens altas na frequência de colonização de suas crianças com um mês de idade, edêntulas, e após a erupção dos primeiros dentes. Verificou-se que a aplicação do verniz em dezesseis mães com contagens altas de *S. mutans* resultou em redução significativa na contagem dos bebês aos dois anos de idade.

Em estudo dinamarquês, Tanner et al. (2002) coletaram amostras bucais de 174 crianças dentadas e 18 pré-dentadas de 6 a 36 meses de idade e de suas babás, sendo usadas provas de DNA. Um alto percentual de crianças foi positivo para a detecção de uma espécie individual quando sua cuidadora era também positiva. Por regressão logística houve significativa associação entre espécies identificadas. Os autores puderam concluir que patógenos orais foram detectados em crianças pré-dentadas.

Okada et al. (2002) fizeram um estudo em cento e quatro crianças de 2 a 12 anos de idade, em que foram analisadas amostras de placa dental retidas em escovas de dente estéreis, para posterior análise por PCR, e avaliação da ocorrência de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*. Das crianças avaliadas, três delas foram positivas tanto para *A. actinomycetemcomitans* quanto para *P. gingivalis*. A idade mínima para colonização foi de 3 anos e 5 meses para *A. actinomycetemcomitans* e 5 anos e 3 meses para *P. gingivalis*.

Yang et al. (2002) fizeram análise da placa bacteriana de 142 pares de mães e crianças de 6 a 36 meses de idade. Os periodontopatógenos foram encontrados

em 71% das crianças, havendo forte correlação entre sangramento a sondagem nas crianças e colonização por *T. forsythia*. *A. actinomycetemcomitans* foi encontrado raramente nos indivíduos avaliados.

Cariño et al. (2003) avaliaram a prevalência e severidade da cárie dentária em uma amostra de 993 crianças na faixa etária de 2 a 6 anos de idade. Aos dois anos, a prevalência obtida foi de 59%, aos três anos, de 85%, aos 4, 90% e aos cinco e seis anos, foi de 94 e 92%. Quanto aos hábitos, a grande maioria das crianças era amamentada no peito juntamente com a mamadeira. Com relação à higiene bucal, a maioria a havia iniciado aos dois anos de idade, sendo hábito rotineiro, porém sem a supervisão dos pais. A grande maioria das crianças avaliadas havia ido ao consultório odontológico por razões emergenciais. Quanto maior a faixa etária, maior a prevalência de cárie, provavelmente devido à introdução de alimentos açucarados na dieta alimentar. Os resultados obtidos fizeram com que estes concluíssem que: a cárie precoce da infância é um problema de saúde pública; que se deve adotar a fluoretação suplementar como medida preventiva; e aumentar os cuidados odontológicos na fase pré-escolar.

Lingstrom et al. (2003) avaliaram o efeito de mudanças na dieta alimentar e a prevalência de cárie, incluindo a substituição total ou parcial da sacarose por substitutivos ou a introdução de alimentos protetores a gomas de mascar. Os resultados quanto à introdução de sorbitol e xilitol a gomas de mascar foram inconclusivos segundo os autores.

Ooshima et al. (2003) avaliaram 144 crianças de 2 a 13 anos de idade, através de amostras de placa coletadas com curetas periodontais nos caninos decíduos e submetidas a PCR. Os autores não encontraram bactérias periodontopatogênicas na placa dental das crianças aos dois anos de idade, porém a porcentagem de crianças livres de bactérias diminuiu conforme aumentou a idade. *C. sputigena*, *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*, *C. ochracea*, *T. forsythia*, e *E. corrodens* foram mais freqüentemente encontrados em saliva do que em placa. *P. nigrescens* e *C. rectus* foram mais encontrados em placa do que saliva.

Amostras de saliva e placa dental foram analisadas por Spolidorio et al. (2003), em vinte e duas famílias brasileiras. As colônias de *S. mutans* foram isoladas, caracterizadas bioquimicamente com base na fermentação de carboidratos, e o polimorfismo genético foi pesquisado através da técnica de AP-PCR, utilizando primer OPA-13. Os fragmentos de DNA obtidos foram amplificados e

comparados, através de eletroforese, sendo que em três famílias analisadas o pai apresentou linhagens com similaridade genética às dos bebês. Em doze famílias a similaridade foi verificada entre mães e bebês, e sete bebês apresentaram similaridade de linhagem com as do irmão mais velho. Concluindo, os autores afirmaram que a técnica foi eficaz em demonstrar o polimorfismo genético de *S. mutans*.

Suda et al. (2003) realizaram estudo em 95 escolares de 8 a 11 anos, em que foi realizada coleta de saliva e placa dental do sítio mésio-vestibular do primeiro molar superior, para avaliação através da técnica indireta da imunofluorescência. *E. corrodens* foi encontrado em 83,2% dos pacientes avaliados, e *C. rectus*, em 84,2%. Já *T. forsythia*, juntamente com *A. actinomycetemcomitans*, foram as bactérias mais freqüentes em crianças de 10 a 11 anos com sítios de PI 2 ou 3 e cálculo. *P. gingivalis* foi detectada em sítios com cálculo, BOP positiva e PI igual a 2 ou 3.

Wan et al. (2003) realizaram um estudo com o objetivo de estabelecer a taxa de infecção e idade média da colonização por *S. mutans* após erupção dentária em 72 bebês de 6 a 24 meses de idade. A cada três meses, do nascimento até 24 meses, foram realizados exames clínicos, preenchimento de questionários e coleta de saliva não-estimulada da língua e dentes de mães e bebês. Após a coleta do material, as amostras foram processadas para análise microbiológica em Ágar *S. mutans*-seletivo-triptone-yeast-cisteína-sucarose-bacitracina. Foram avaliados somente os bebês que ainda não haviam sido colonizados por *S. mutans*. Dos 312 bebês, somente 111 possuíam os critérios para a inclusão na pesquisa. Aos 24 meses, 79% das 312 crianças apresentavam *S. mutans*. A idade principal e média para colonização em crianças portadoras de dentes foi de 15,7 e 16 meses respectivamente. Além disso, nesta faixa etária, 9% das crianças colonizadas por *S. mutans* apresentaram cárie, enquanto que nenhuma das que não apresentavam a bactéria, apresentavam cárie. Os fatores que podem estar associados com a colonização por *S. mutans* são: ingestão noturna de fluidos açucarados, exposição freqüente a açúcar e petiscos, compartilhar comida com adultos e níveis maternos elevados de *S. mutans* na saliva. Em contraste, a não-colonização estava associada à escovação dental e uso de antibióticos.

Davenport et al. (2004) determinaram a prevalência de cárie dentária em cem crianças nascidas pré-termo e com baixo peso, comparando a índices observados em crianças normais. As crianças nascidas com baixo peso são mais

freqüentemente amamentadas por mamadeira, porém as nascidas com peso normal prolongam este hábito por tempo maior. Sessenta crianças tiveram experiência de cárie dentária, sendo esta, mais freqüente em crianças nascidas com peso normal e garotos, em comparação com as meninas e as crianças nascidas pré-termo. Os autores puderam concluir que as crianças nascidas pré-termo têm menor índice de cárie, por terem hábitos de dieta alimentar mais pobres.

Ersin et al. (2004) investigaram a transmissão de *S. mutans* entre mãe, pai e criança, em um grupo de 8 famílias, usando PCR. As mães que apresentavam altos níveis de *S. mutans* na saliva não-estimulada e crianças de 2 a 3 anos participaram da pesquisa. Isolados de *S. mutans* foram obtidos da placa bacteriana das crianças com palitos de dentes estéreis entre nove e onze horas da manhã. As amostras foram então processadas para determinação bacteriana. Os resultados obtidos foram que todas as mães e pais dividiam genótipos similares com as crianças, sugerindo que estes podem ser fonte de transmissão de *S. mutans* para as crianças.

Hamlet et al. (2004) coletaram amostras de placa bacteriana com cones de papel de primeiros molares e incisivos de 28 adolescentes de 11 a 13 anos, para posterior análise por PCR para determinação de *T. forsythensis*, correlacionando com a perda de inserção. De cinquenta e seis indivíduos envolvidos na pesquisa, trinta e seis apresentaram esta bactéria, em algum dos estágios, durante os três anos da pesquisa, havendo grande correlação com a perda de inserção. As taxas de perda de inserção foram 8,16 vezes mais altas nas crianças infectadas em cada exame.

Klein et al. (2004) realizaram estudo longitudinal de transmissão, diversidade e estabilidade de *S. mutans* e *S. sobrinus* com dezesseis pares de mãe e filhos brasileiros. Após vinte meses de monitoramento, concluiu-se que os genótipos destas bactérias adquiridas de fontes maternas ou alternativas podem mostrar efetiva persistência na cavidade bucal e/ ou atuação transitória na boca da criança, refletindo no desenvolvimento contínuo da microbiota bucal em crianças.

Lindquist e Emilson (2004) determinaram a aquisição inicial de *S. mutans* e *S. sobrinus* em crianças cujas mães apresentavam ambas as espécies, além de o risco de transmissão das duas espécies ser similar, detecção da bactéria e prevalência de cárie até sete anos de idade, e examinar a aquisição e persistência de diferentes genótipos em pares de crianças e mães. Foram avaliadas doze mães de quinze crianças, com três mães possuindo dois filhos cada. As avaliações se iniciaram

quando as crianças completaram seis meses de idade, ocorrendo a cada seis meses até completarem três anos e uma vez ao ano, até completarem sete anos de idade. Foi coletada saliva estimulada de pares de crianças e mães, e placa proveniente de dentes e língua das crianças. As amostras obtidas foram analisadas em laboratório. Além disso, foi realizado levantamento da prevalência de cárie dentária. Das crianças avaliadas, dez adquiriram *S. mutans* durante os sete anos de pesquisa, em que quatro delas eram colonizadas pelas duas espécies, *S. mutans* e *S. sobrinus*. O tempo para aquisição inicial de *S. mutans* na saliva variou entre 1,5 e 5 anos de idade, e para *S. sobrinus* entre 2 e 7 anos. Um total de vinte e seis genótipos foram encontrados nas crianças e nove deles eram idênticos aos das mães. A experiência de cárie foi considerada baixa no período estudado, envolvendo oito crianças.

Rosenblatt e Zarzar (2004) avaliaram a prevalência de cárie precoce da infância em 468 crianças de 12 a 36 meses de idade, pertencentes a famílias de condições sócio-econômicas baixas atendidas na clínica pediátrica do Centro Médico Amaury de Medeiros (Maternidade da Universidade de Pernambuco - Recife). Foram realizados exames clínicos visuais na sala de espera do Hospital, sob iluminação natural, após a realização da limpeza dos dentes com gaze. As mães foram entrevistadas com relação ao tipo de alimentação dos bebês, número de refeições contendo açúcares no dia, ingestão de açúcares, dieta alimentar habitual, início e tipo de higienização bucal. Com relação aos resultados obtidos, a associação entre o sexo e a prevalência de cárie dentária, não foi estatisticamente significativa. Das crianças avaliadas, 103 (28,46%) apresentaram cárie e 335 (71,6%) não apresentaram. Com relação ao aleitamento, 327 (69,9%) foram amamentadas com mamadeiras contendo açúcares, apesar de esta informação não ter sido estatisticamente significativa. A cárie dentária foi mais prevalente nas crianças com dieta alimentar cariogênica (31,8%), sendo a associação altamente significativa. As associações entre o número de refeições açucaradas e presença de cárie, assim como, higienização bucal, foram significantes. Pode-se concluir que a prevalência de cárie dentária em crianças de 12 a 36 meses de idade provenientes de famílias brasileiras de baixa renda é extremamente alta comparada a outras partes do mundo. Não houve correlação da cárie precoce da infância com o tipo de aleitamento, e sim com a idade, ingestão de açúcares entre as refeições e dieta alimentar cariogênica.

Suda et al. (2004) analisaram através da técnica indireta de imunofluorescência amostras de placa da mesial de primeiros molares inferiores de 105 estudantes de 15 anos de idade. Estes autores puderam verificar que *P. gingivalis* e *T. forsythia* são encontradas em dentes com profundidade de sulco maior ou igual a 3,5 mm. *E. corrodens* foi encontrado em 89,7% das crianças avaliadas, já *T. forsythia* em 60,7%, *A. actinomycetemcomitans* do tipo b, em 31,8% e do tipo c em 21,5%. *C. rectus* estava presente em 84,2%, e *P. gingivalis* em 47,7%.

Já Umeda et al. (2004) avaliaram 56 crianças de 1 a 15 anos de idade, e seus pais, a partir da análise de amostras de placa e saliva, processadas por PCR. Verificou-se que crianças do sexo feminino em fase de dentição mista apresentam *T. forsythia* com maior freqüência, do que as do sexo masculino. Aqueles pais que não apresentavam bactérias do tipo *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *P. intermedia*, as mesmas também não foram observadas na cavidade bucal de seus filhos. Porém, estas bactérias foram detectadas mais freqüentemente na cavidade bucal das crianças cujos pais apresentavam estes patógenos. *A. actinomycetemcomitans* foi encontrado em crianças livre de cálculo ou inflamação gengival em dentição decídua. Já *T. denticola* foi encontrada com maior freqüência em dentição mista. *C. rectus* foi a bactéria mais prevalente oscilando de 80 a 100% de freqüência nas crianças avaliadas.

Vachirarojpisan et al. (2004) avaliaram a relação entre fatores sócio-econômicos e comportamentais e a severidade da cárie precoce da infância em crianças tailandesas de 6 a 19 meses de idade. A metodologia da pesquisa envolveu preenchimento de questionários, exames clínicos e contagens de *S. mutans*. As 520 crianças foram divididas em grupos por idades e dentes erupcionados. Na faixa etária de 15 a 19 meses, a prevalência de cárie dentária foi de 82,8%. Os índices foram maiores nas crianças provenientes de famílias pobres e de baixo nível educacional, além disso, nas crianças cujas mães e babás possuíam altos índices de cárie, eram amamentadas no peito e que possuíam altos níveis de *S. mutans* na boca, apesar de somente os níveis de *S. mutans* terem sido estatisticamente significantes. Concluindo, os autores afirmam que a cárie precoce da infância tem prevalência alta, necessitando de apoio de programas preventivos em idade precoce.

Arthur et al. (2007) avaliaram a diversidade genotípica de *S. mutans* no biofilme dental formado in situ, sob exposição freqüente a sacarose, carboidratos fermentáveis e indutor de síntese de EPS, e, como controle, seus monossacarídeos, glicose e frutose, que são somente fermentáveis. Foram utilizados 7 voluntários saudáveis, de 18 a 28 anos de idade, dos quais foram obtidos espécimes salivares de *S. mutans* que foram congelados para posterior utilização. Estes voluntários utilizaram dispositivos intra-orais na região palatina contendo 6 blocos de esmalte dental humano sadio, submetidos oito vezes ao dia a irrigações com água deionizada (controle negativo), mistura de glicose e frutose (acidogênico), sacarose (acidogênico e indutor de EPA). O biofilme formado no esmalte foi coletado após 3, 7 e 14 dias e cultivados em Ágar Mitis Salivarius, e processadas para análise em AP-PCR. Esta análise demonstrou que genótipos salivares foram também detectados em todas as amostras de biofilme, independente do tratamento utilizado.

Lembo et al. (2007) analisaram números de genótipos de *S. mutans* em sítios orais de crianças com diferentes experiências de cárie e determinaram propriedades adesivas e habilidade destes genótipos de sobreviver em ambientes ácidos. Foram coletadas amostras de saliva estimulada de língua e dentes de dez crianças não-portadoras de cárie e onze crianças com lesão de cárie na faixa etária de 5 a 8 anos de idade. Foram isolados 339 genótipos de *S. mutans* detectados por PCR. Um isolado de cada genótipo foi testado por sua susceptibilidade ácida e habilidade de formar biofilme. Foram determinados cinquenta e um genótipos distintos, de 1 a 3 genótipos em cada amostra. Um único genótipo foi detectado em sete crianças, enquanto que as quatorze restantes exibiram de 2 a 7 genótipos. Não houve diferença significativa no número de genótipos detectados entre crianças portadoras ou livres de cárie. Não se observou relação entre o número de genótipos e os níveis salivares de *S. mutans*. Os genótipos com baixa susceptibilidade a desafios ácidos foram estatisticamente mais freqüentes entre isolados de crianças ativas do que entre crianças livres de cárie. O presente artigo sugere haver diferenças na distribuição de genótipos de *S. mutans* de acordo com o sítio bucal, e que populações de *S. mutans* diferem na susceptibilidade a ácidos e habilidade de formar biofilme.

Moreira et al. (2007) realizaram revisão da literatura acerca dos fatores determinantes na epidemiologia e transmissibilidade da doença cárie e sua relação com a bactéria *Streptococcus mutans*. Os autores sugerem que a transmissão da

bactéria entre indivíduos pode ser essencialmente devido a fatores inter-relacionados como afinidade bacteriana e número de unidades de colônias formadas, capazes de promover o ataque.

Öhlund et al. (2007) analisaram associações entre cárie dentária, níveis salivares de *S. mutans* e lactobacilos, e dieta alimentar, enfatizando especialmente a ingestão de carboidratos fermentáveis, em uma população de 4 anos de idade, pertencente a uma região de baixa prevalência de cárie dentária. O grupo de estudo consistiu 234 crianças, das quais, 124 receberam a análise da dieta alimentar através de diário alimentar, exames clínicos intra-orais, que avaliaram a presença de cárie, placa visível e inflamação gengival. Além disso, foram coletadas amostras de saliva estimulada para determinação de contagens de *S. mutans* e lactobacilos em ágar mitis-salivarius e ágar rogosa. *S. mutans* foi encontrado em amostras de 44 % das crianças, sendo correlacionado significativamente com a prevalência de cárie. Verificou-se presença de placa visível em 19% das crianças, sendo que a experiência de cárie foi maior nas crianças que possuem maior acúmulo. Na avaliação dietética, o queijo mostrou não ter correlação com a cárie, assim como nenhum outro alimento.

Rêgo et al. (2007) avaliaram a transmissão de *A. actinomycetemcomitans* entre trinta mulheres brasileiras com periodontite crônica e suas crianças. Foi realizada coleta de placa subgengival em três sítios, que foram posteriormente submetidos a cultura microbiológica. O microrganismo estudado foi encontrado em oito das trinta mães avaliadas, que tiveram oito filhos submetidos a análise, porém, somente duas apresentaram o microrganismo. Por esta razão, não foi detectada transmissão entre mães e filhos de *A. actinomycetemcomitans*.

Sakai et al. (2007) avaliaram a prevalência de patógenos periodontais (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *Treponema denticola*) na saliva de sessenta e quatro crianças em dentição mista, em diferentes tempos (um ano), por meio de PCR, correlacionando com achados clínicos de parâmetro gengival. Foram realizados exames clínicos em consultório, em que foi avaliado o grau de severidade da inflamação gengival (leve, moderado e severo), além disso, foi realizada coleta de saliva não-estimulada. As amostras recolhidas foram então processadas para extração de DNA e realização de PCR. Os resultados obtidos demonstraram, após análise estatística, que 62 (96,9%) e 50 (83,3%) das crianças avaliadas apresentavam inflamação gengival leve, apesar

de 2 (3,1%) e 10 (16,7%) apresentarem escores moderados nas duas avaliações. A maioria das crianças (81,2% no primeiro período, e 73,3% no segundo) possuía níveis detectáveis de pelo menos um tipo de bactéria. A prevalência encontrada foi de 4,7% e 1,7% para *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, 6,3% e 8,3% para *Porphyromonas gingivalis*, 23,4% e 48,3% para *Prevotella nigrescens*, e 71,9% e 50% para *Treponema denticola*. Não foi encontrada relação significativa entre índice gengival e presença dos patógenos e combinação de diferentes espécies.

Baca et al. (2008) avaliaram a possibilidade de cadeias de *S. mutans* serem detectadas efetivamente em amostras de saliva estimulada ou placa, provenientes de superfícies bucais e oclusais de primeiros molares permanentes. Foram avaliadas vinte crianças em faixa etária escolar (de 6 a 7 anos de idade), cujas amostras eram positivas para *S. mutans*. As amostras foram cultivadas em Agar MSB. Todos os isolados identificados como *S. mutans* foram analisados genotipicamente por PCR. Foram isolados vinte e oito genótipos: 23 em amostras de saliva, 23 em amostras de placa da superfície bucal dos molares e 16 em amostras de placa da superfície oclusal dos molares. Apesar de amostras de saliva não revelarem todos os genótipos isolados, foi equivalente em termos de efetividade quando comparada a amostras de placa, sendo mais efetiva esta última quando coletada em fissuras.

De Soet et al. (2008) avaliaram 490 crianças em idade escolar, no Suriname, nos anos de 2002 a 2005. Foram realizados exames clínicos nas crianças, e tratamento das necessidades odontológicas, em diferentes estratégias. Foram coletadas amostras de saliva e sangue na data de início e um ano após, para determinação das concentrações de AGP, CRP, neopterin, *S. mutans* e CD 14-260. Não houve associação significativa entre as estratégias de tratamento e os parâmetros avaliados. Os autores puderam concluir que a saúde geral não é significativamente afetada pelo tratamento das lesões cariosas.

Nakano et al. (2008) avaliaram vinte e seis crianças por um período de sete anos, com relação à colonização de bactérias periodontopatogênicas. Foram realizadas coletas de placa bacteriana e saliva nos períodos de 1999-2000 e 2006-2007. As amostras foram processadas para análise através de PCR, principalmente para detecção de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*. Esta última foi a espécie mais freqüente. As taxas de detecção no segundo período foram significativamente maiores do que no primeiro. Concluindo, pode-se afirmar que indivíduos abaixo de dez anos de idade, que possuem pelo menos uma

das bactérias periodontopatogênicas, ou *C. rectus* tem risco aumentado de desenvolver espécies bacterianas periodontais durante a adolescência ou na fase de adultos jovens.

Vicente et al. (2008) avaliaram a presença de *S. mutans* na saliva e a prevalência da doença cárie em escolares da rede pública de ensino do Paraná, estabelecendo o risco individual para o desenvolvimento da doença. Foram avaliadas 237 crianças na faixa etária de 5 a 11 anos, das quais foram coletadas amostras de saliva não-estimulada, que sofreram cultivo microbiológico, juntamente com o exame clínico realizado no pátio da escola com luz natural. A partir dos resultados das análises microbiológicas pode-se observar que 81% das crianças apresentavam altas contagens de *S. mutans* na saliva, e apenas 19% apresentavam baixas contagens. Em relação ao índice de atividade de cárie, verificou-se que 73% das crianças apresentavam alta prevalência da doença, os outros 27% se dividiam entre média e baixa. Entre as crianças com alta prevalência, 83,5% apresentavam altas contagens de *S. mutans*, confirmando a relação entre risco microbiológico e a prevalência de cárie dentária.

Alves et al. (2009) avaliaram a colonização inicial por *Streptococcus mutans* em 119 lactentes por um período de 1,5 anos, rastreando a transmissão entre criança- criança, babá- criança, mãe- criança. A pesquisa se iniciou quando os bebês possuíam entre 5 a 13 meses de idade, realizando-se exames periódicos a cada seis meses, em que foram avaliados os níveis orais de *Streptococcus mutans* e o desenvolvimento de lesões cariosas. Foram encontrados 1392 isolados desta bactéria, que foram submetidos à análise por PCR e cromossomal genotipagem. Os níveis salivares de *S. mutans* mostraram correlação com a presença de lesões cariosas, sendo que 40,3% das crianças apresentaram esta bactéria. Porém, não foi encontrada semelhança entre genótipos examinados entre crianças, mães e babás.

Kishi et al. (2009) avaliaram a relação entre níveis salivares quantitativos de *S. mutans* e *S. sobrinus* em mães, presença de cárie e a colonização por estas bactérias em amostras de placa de crianças de 2,5 anos de idade. Foram coletadas amostras de saliva das mães, e placa das crianças que foram submetidas à análise por PCR e cultura, além da determinação da prevalência de cárie dentária nas crianças por um período de dois anos. Os resultados obtidos comprovaram a similaridade de níveis salivares destes dois patógenos nos pares de mães e crianças.

Papaioannou et al. (2009) coletaram amostras microbianas de noventa e três crianças de três a doze anos de idade, da cidade de Atenas. As amostras foram submetidas à técnica de hibridização DNA- DNA, e os resultados obtidos evidenciaram que as espécies bacterianas diferiram significativamente entre locais de coleta, sugerindo padrões de colonização. Os periodontopatógenos mostraram aumento proporcional ao aumento da idade das crianças, principalmente as bactérias consideradas do complexo vermelho.

Tankkunnasombut et al. (2009) avaliaram duzentas e trinta e duas crianças na faixa etária de dois a trinta e seis meses de idade, pacientes da Clínica de Bebês de Bangkok, na Tailândia. As crianças foram divididas em três grupos, um composto por edêntulos, outro composto por crianças que possuíam de um a oito dentes irrompidos e outro grupo composto por crianças que possuíam de nove a vinte dentes irrompidos. As amostras microbiológicas foram coletadas com zaragotoas, que foram friccionadas na região de alveolar, língua e mucosa. Para a determinação de contagens de *S. mutans*, as amostras foram diluídas e cultivadas em placas contendo Ágar Mitis Salivarius com bacitracina. A colonização por estas bactérias foi encontrada em 26% das crianças, com idade média de 20 meses, em crianças edêntulas ocorreu em 2% dos casos, e sempre antes dos dois anos de idade. Estatisticamente, não houve correlação entre a colonização por *S. mutans* e hábitos de higiene e dieta alimentar. A porcentagem de crianças colonizadas por este patógeno aumentou com significativamente com a idade e o número de dentes irrompidos. Os resultados sugerem que a prevenção da colonização inicial em algumas populações deve se iniciar prioritariamente antes da erupção dos dentes decíduos.

Proposição

3 Proposição

*E*m função do papel desempenhado pela microbiota bucal e por diferentes fatores predisponentes no estabelecimento e progressão da cárie dentária e patologias periodontais, esse estudo longitudinal objetivou avaliar quantitativa e qualitativamente a microbiota residente do biofilme bucal e saliva de mães e pares de crianças de 6, 12, 18 e 24 meses de idade submetidas a atendimento odontológico, relacionando-a com dieta alimentar, presença ou não de dentes, prevalência de cárie dentária e condição gengival.

Material e Métodos

4 Material E Métodos

Todos os procedimentos descritos a seguir passaram previamente pela aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Processo FOA 2006 – 01470) (Anexo A).

Como a filosofia do atendimento aos pacientes que ingressam no programa da Bebê Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP é preferencialmente educativa e preventiva, o primeiro passo foi o agendamento dos responsáveis pelo bebê para assistirem uma palestra sobre a importância do estabelecimento de hábitos adequados de higiene bucal, dieta alimentar, valorização dos dentes decíduos, os cuidados necessários para a manutenção da saúde bucal, funcionamento da Bebê Clínica, dentre outros temas. Cumprida esta exigência, e de que a criança não tenha atingido um ano de idade, o paciente passou a integrar o quadro de participantes do programa, sendo atendido com retornos agendados de periodicidade bimensal, permanecendo nesta rotina de atendimento periódico até completar quatro anos de idade. A descrição da rotina de atendimento da Bebê Clínica-Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP encontra-se detalhada em trabalho publicado por Cunha et al. (2000).

CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Fizeram parte da avaliação inicial, para comporem a amostra desta pesquisa, pacientes da bebê-clínica que se adequassem aos seguintes pré- requisitos: crianças edêntulas, pertencentes ao programa da Bebê – Clínica, que não estavam fazendo uso de antimicrobianos nos 3 meses que precederem a coleta de espécimes clínicos, pacientes não portadores de necessidades especiais e pacientes cujas mães concordassem em participar da pesquisa.

ANAMNESE AOS 6, 12, 18 e 24 MESES DE IDADE

Foi realizado estudo longitudinal, que avaliou as crianças nas faixas etárias de 6, 12, 18 e 24 meses de idade, correlacionando a microbiota presente com a

microbiota materna, além de fatores de higiene, dieta alimentar, condição gengival, prevalência de cárie dentária e erupção dentária.

Em todos os períodos estabelecidos para análise (6, 12, 18 e 24 meses de idade) foi aplicado um questionário em que as mães foram indagadas quanto ao tipo de alimentação e higiene bucal das crianças. A seguir foi realizada a coleta de saliva e de biofilme para posterior análise microbiológica. Posteriormente foi realizada higiene bucal com auxílio de gaze embebida em água oxigenada diluída (3:1), e o exame clínico, sob luz artificial e espelho clínico, que incluía a avaliação da condição gengival, presença de dentes e prevalência de cárie dentária.

Após a coleta de saliva, foi então realizado o exame clínico, em que foram avaliadas a condição gengival, a presença de dentes e a prevalência de cárie dentária. Ao exame clínico intra bucal, foram verificadas as condições dos tecidos moles e rodetes gengivais (nas crianças de até seis meses de idade).

Nas demais faixas etárias, além das estruturas acima descritas, foram avaliados também os elementos dentários. Como sabemos que nas crianças que estão passando pelo processo de erupção dentária, existe grande variedade de profundidade do sulco gengival, e também pelo fato de o comportamento de choro contínuo ser constante nesta faixa etária, optou-se pela realização de exame periodontal sem a utilização de sondas periodontais, baseando-se então pela presença ou ausência de inflamação gengival, presença de cálculo dentário, coloração, textura e sangramento gengival. Foram observadas as faces mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual e distolingual de cada dente.

A condição clínica dos dentes presentes foi avaliada segundo os critérios de Melhado (2003) com seus respectivos códigos:

- Dente hígido (H) - dente apresentava-se livre de cárie dentária;
- Cárie em esmalte sem cavitação (CESC) - pelo menos uma das superfícies apresentando lesão de mancha branca em decorrência da desmineralização do esmalte;
- Cárie em esmalte com cavitação (CECC) - pelo menos uma das superfícies apresentando lesão cariiosa cavitada em esmalte;
- Cárie em dentina (CDEN) - pelo menos uma das superfícies apresentando lesão cariiosa cavitada em dentina.

LEVANTAMENTO DA DIETA ALIMENTAR – 12,18 e 24 meses de idade

Aos seis meses, durante a anamnese, através de questionário, as mães foram indagadas quanto ao tipo de aleitamento, se materno ou artificial, e qual o conteúdo da mamadeira, e existência de hábitos de aleitamento noturno. Como até a idade dos seis meses recomenda-se que a criança seja alimentada exclusivamente por leite materno, não foi aplicado diário alimentar nesta fase inicial do trabalho, somente foi questionado se a criança fazia ingestão de outros alimentos.

Para esta avaliação foi utilizado o Registro da Dieta alimentar, preconizado por Thylstrup e Fejerkov (2001), no qual foram registrados a quantidade, frequência e composição da alimentação ingerida durante o período de 7 dias, que precederem a coleta dos espécimes clínicos. Com relação ao padrão de consumo de alimentos cariogênicos, avaliado através dos diários alimentares preenchidos pelas mães, em que elas fizeram anotações dos alimentos ingeridos pelas crianças no período de 7 dias, os dados foram tabulados como detalhado a seguir. Os alimentos contendo carboidratos, açúcares e seus derivados foram agrupados conforme a frequência de seu consumo em pontos, entre diário (5 pontos), semanal (2 pontos) ou consumo raro (1 ponto). Estes pontos foram somados para classificar o padrão de consumo de alimentos cariogênicos em alto e moderado. A frequência de ingestão foi considerada alta, quando a soma de valores ponderados foi igual ou maior a 30; e moderado, quando a soma de valores for menor que 30 (FRAIZ, 1998; LLENA; FORNER, 2008).

COLETA DOS ESPÉCIMES CLÍNICOS – AVALIAÇÃO MICROBIOTA BUCAL 6, 12, 18 E 24 MESES DE IDADE:

CRIANÇAS.

A coleta de saliva foi realizada antes do exame clínico, uma vez que para realização deste último precedeu-se a limpeza da cavidade bucal da criança, podendo esta interferir nos resultados microbiológicos. Para as crianças edêntulas, foram realizadas no período da manhã, utilizando-se zaragatoas estéreis, que coletavam gentilmente 0,1 mL de saliva na região dos rodetes gengivais e região sublingual.

Para as crianças que já possuíam dentes, o biofilme dental era coletado com cones de papel absorvente que eram gentilmente introduzidos no interior do sulco

gengival, enquanto a saliva continuou sendo coletada segundo o método descrito acima para crianças edêntulas.

A seguir, as amostras foram transferidas para meio de transporte VMGA III, para minimizar o contato com o oxigênio atmosférico, para as amostras que foram submetidas a cultivo microbiológico e para água super pura (MilliQ), para os espécimes destinados a extração de DNA.

MÃES

Como descrito acima, a coleta de saliva e do biofilme dental foi realizada antes do exame clínico. As mães foram orientadas a depositar, em microtubos, pelo menos 0,1mL de saliva não estimulada, que fora transferido para banho de gelo até a extração do DNA microbiano. As coletas também foram realizadas no período da manhã e as mães eram instruídas a não escovarem os dentes, se alimentarem ou ingerirem bebidas pelo menos uma hora antes da coleta dos espécimes clínicos.

O biofilme foi coletado com cones de papel absorvente que foram gentilmente introduzidos no interior do sulco gengival ou bolsas periodontais, em que permaneciam por aproximadamente 30 segundos e foram transferidos para microtubos contendo água ultra-pura MilliQ, que foram mantidos em gelo.

PROCESSAMENTO DOS ESPÉCIMES CLÍNICOS PARA CULTIVO MICROBIOLÓGICO

No laboratório, os espécimes clínicos transportados em meio VMGA III foram submetidos a diluições seriadas em solução de diluição VMGA I e alíquotas de 0,1 ml foram inoculadas em placas contendo os seguintes meios de cultura e submetidos as seguintes condições de incubação (GAETTI-JARDIM JÚNIOR, 2006):

- ágar Fastidious Anaerobe (FAA) enriquecido com extrato de levedura (0,5%), hemina (5 µg/mL), menadiona (1 µg/mL) e 5% de sangue desfibrinado de cavalo, incubado em anaerobiose (90 % N₂ + 10% CO₂), a 37° C, por 7 e 14 dias, para isolamento dos anaeróbios;
- ágar TSBV, incubado em anaerobiose, a 37° C, por 2, e 4 dias para isolamento de *A. actinomycetemcomitans*;

- ágar Mitis Salivarius Bacitracina, com e sem sacarose, incubado em anaerobiose, a 37° C, por 3 dias, para isolamento de estreptococos bucais, em particular os estreptococos do grupo mutans;
- ágar de tripticaseína de soja acrescido de 5% de sangue desfibrinado de cavalo, incubado em aerobiose, a 37° C, por 2 e 3 dias para isolamento de aeróbios e anaeróbios facultativos;

Após o isolamento microbiano e obtenção de cultura pura, foram realizadas as análises morfo celular (método de Gram) e morfo colonial dos mesmos, além do teste respiratório, para caracterizar o relacionamento dos diferentes microrganismos com o oxigênio atmosférico, e prova da catalase. A seguir procedeu-se a identificação ao nível de gênero e, quando possível, nível de espécie dos isolados. A identificação microbiana foi realizada através de “kits comerciais” Rapid ID 32A (BioMérieux), para os bastonetes Gram negativos e Gram positivos anaeróbios obrigatórios, Rapid ID 32Strep e API 20 Strep. (BioMérieux), para cocos Gram positivos, catalase negativa, e RapID ANA II (Innovative Diagnostic Systems Inc.) para cocos e bastonetes Gram negativos e Gram positivos, anaeróbios obrigatórios. Também foram realizados testes de fermentação de carboidratos, hidrólise da esculina, hemaglutinação, hemólise, coagulase, catalase, produção de gás, indol e sulfeto de hidrogênio para completar a identificação microbiana.

ANÁLISE DA MICROBIOTA BUCAL POR PCR E REAL-TIME PCR

A presença de *Actinomyces* sp., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* na saliva e no biofilme subgingival, foi realizada através de amplificação do DNA por PCR convencional (OHO et al., 2000; XIA; BAUMGARTNER, 2003) empregando-se iniciadores específicos para cada um dos microrganismos alvo. A tabela 1 apresenta os iniciadores específicos que foram utilizados nos procedimentos de amplificação do DNA bacteriano pelo PCR convencional.

Os níveis salivares de estreptococos do grupo mutans (*S. mutans* e *S. sobrinus*) de mães e bebês também foram avaliados por real-time PCR,

empregando-se o sistema TaqMan na amplificação. Os oligonucleotídeos utilizados nesse sistema são apresentados na Tabela 2.

Nas crianças edêntulas apenas a saliva era avaliada, enquanto nas mães e crianças com dentes, acrescentava-se também as amostras de biofilme.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados nos ensaios de amplificação do DNA bacteriano.

Iniciadores específicos	Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento
<i>Actinomyces</i> sp.	5'-GGC KTG CGG TGG GTA CGG GC- 3'	53°C
	5'-GC TTT AAG GGA TTC GCT CCR CCT CAC- 3'	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	5'-GCT AAT ACC GCG TAG AGT CGG- 3'	60°C
	5'-ATT TCA CAC CTC ACT TAA AGG T- 3'	
<i>C. rectus</i>	5'-TTT CGG AGC GTA AAC TCC TTT TC- 3'	60°C
	5'-TTT CTG CAA GCA GAC ACT CTT- 3'	
<i>E. corrodens</i>	5'-CTA ATA CCG CAT ACG TCC TAA G- 3'	55°C
	5'-ACT GTT AGC AAT CAA GTT GCC C- 3'	
<i>F. nucleatum</i>	5'-ATT GTG GCT AAA AAT TAT AGT T- 3'	55°C
	5'-ACC CTC ACT TTG AGG ATT ATA G- 3'	
<i>P. gingivalis</i>	5'-AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG- 3'	40°C
	5'-ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT- 3'	
<i>P. intermedia</i>	5'-TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG- 3'	57°C
	5'-TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T- 3'	
<i>S. mutans</i>	5'- ACT ACA CTT TCG GGT GGC TTG G- 3'	59°C
	5'- CAG TAT AAG CGC CAG TTT CAT C- 3'	
<i>S. sobrinus</i>	5'- GAT AAC TAC CTG ACA GCT GAC T- 3'	59°C
	5'- AAG CTG CCT TAA GGT AAT CAC T- 3'	
<i>T. forsythia</i>	5'-GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA- 3'	60°C
	5'-TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T- 3'	
<i>T. denticola</i>	5'-TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T- 3'	55°C
	5'-TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA- 3'	

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do DNA microbiano por real-time PCR.

Microrganismo	Oligonucleotídeo utilizado	Amplicon (pb)	Gene alvo
<i>S. mutans</i>	5'-GCC TAC AGC TCA GAG ATG CTA TTC T-3'	114	<i>gtfB</i> *
	5'-GCC ATA CAC CAC TCA TGA ATT GA-3'		
<i>S. sobrinus</i>	5'- GGA AAT GAC GGT CGC CGT TAT GAA-3' (sonda)	88	<i>gtfT</i> *
	5'-TTC AAA GCC AAG ACC AAG CTA GT-3'		
	5'-CCA GCC TGA GAT TCA GCT TG T-3'		
	5'-CCT GCT CCA GCG ACA AAG GCA GC-3' (sonda)		

*Genes da enzima glicosiltransferase, associado à produção de polissacarídeos extracelulares.

EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO

O DNA das amostras clínicas foi extraído pelo kit comercial InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Cada amostra foi processada segundo recomendação dos fabricantes (MAEDA et al., 2003).

Cada amostra foi adicionada a 20 µL de proteinase K, seguida de 200 µL do tampão AL, mantendo-se a mistura a 56°C, por 10 minutos, adicionando-se, a seguir, etanol absoluto (200 µL) e centrifugando-se o conjunto através do “QIAamp Column” , a 6000 rpm por 1 minuto. A seguir, desprezava-se o filtrado e adicionavam-se 500 µL do tampão AW1 e repetia-se a centrifugação, desprezando-se, novamente o filtrado. Imediatamente, 500 µL do tampão AW2 eram adicionados a “QIAamp Column” e o conjunto era centrifugado a 14.000 rpm por 3 minutos. Desprezava-se o filtrado, enquanto 200 µL de tampão AE eram adicionados ao “QIAamp Column” por 1 minuto, antes de submeter o conjunto a centrifugação final a 6000 rpm por 1 minuto. O filtrado era mantido a -196°C. A concentração do DNA alvo, em cada amostra, era determinada em espectrofotômetro (Beckman, Modelo DU-640), com leitura da absorvância ($A_{260\text{ nm}}$).

REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR

A amplificação do DNA foi realizada em volumes de 25 µl contendo 2,5 µl de 10 X tampão PCR, 1,25 µl de $MgCl_2$ (50 mM), 2,0 µl de dNTP (10 mM), 0,25 µl de

Taq DNA polimerase (0,5 U), 1,0 µl de cada iniciador (0,4 µM), 7 µl de água ultrapura Milli-Q esterilizada e 10 µl de DNA (ng). A amplificação foi realizada em aparelho de PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400) programado para: 1 ciclo de desnaturação a 94°C (5 min.); 30-36 ciclos a 94°C (30s-1 min.), temperatura de anelamento segundo cada iniciador (Tabela 1), 72°C (30s-2 min.), e 1 ciclo de extensão final do DNA a 72°C (5 min.).

Em todas as reações foi utilizado, como controle positivo, DNA de cepas de referência dos microrganismos estudados, e água ultra-pura como controle negativo. Como controle de peso molecular foram utilizados os marcadores 50 bp DNA ladder (Gene Ruler™) e 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Os produtos da amplificação pelo PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, 90 V por 2 horas, sendo corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e fotografados sobre transiluminador com luz UV com câmara Kodak (Electrophoresis Documentation and Analyses System 120).

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COCOS CARIOGÊNICOS POR REAL-TIME PCR

A quantificação de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* foi realizada através de real-time PCR, empregando-se, para tanto, iniciadores, sondas e condições de amplificação específicas descritas por Yoshida et al. (2003) (TABELA 2). Empregou-se o sistema TaqMan, com sondas específicas para os dois microrganismos-alvo marcadas no sentido 5' com 6-carboxifluoresceína (*reporter dye*) e no sentido 3' com 6-carboxitetrametilrodamina (*quencher dye*).

Inicialmente realizou-se um estudo piloto, onde diluições seriadas de um inóculo conhecido de *S. mutans* e de *S. sobrinus* eram submetidas à cultura em ágar Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose, a 37°C, em anaerobiose, por 72 horas. A seguir, em contador de colônias, determinava-se o número de unidades formadoras de colônias de cada uma das espécies e obtinha-se uma curva populacional das diluições do inóculo. A seguir, o DNA microbiano das mesmas diluições era extraído e a quantificação do inóculo era realizada em real-time PCR, conforme descrito a seguir.

Para avaliação da confiabilidade do método, esse procedimento era repetido em decuplicatas, garantindo a observância dos requisitos de homocedasticidade. As

variações do método de cultura e real-time PCR foram comparadas e esse último mostrou diferenças sempre inferiores a 18%, enquanto o método convencional chegou a apresentar variações sempre superiores a 25%, chegando a mais de 70% de variabilidade, optando-se então por considerar apenas os dados obtidos por real-time PCR para determinação das populações de cocos cariogênicos.

As reações de amplificação foram realizadas em volumes finais de 25 µl, contendo 1X Master Mixture TaqMan Universal (tampão PCR, dNTP, AmpliTaq Gold, sinal de referência interno, [6-carboxi-'x'-rodamina], uracil *N*-glicosidase-UNG, MgCl₂; Applied Biosystem, Foster City, Calif), 900 nM de cada iniciador, 200 nM da sonda e 5 µl do DNA. As curvas-padrão foram construídas a partir de diluições conhecidas de DNA de amostras de referência (*S. mutans* ATCC 1910 e *S. sobrinus* ATCC 27607). Essas reações de amplificação foram realizadas em aparelho Rotorgene 600 (Corbett Life Science, Mortlake, New South Wales, Australia).

As condições dos ensaios realizados consistiram de uma etapa inicial de desnaturação a 95°C, por 10 minutos, seguida de 60 ciclos de 95°C por 15 segundos e 58°C por 1 minuto. A curva "threshold" (C_T) foi definida como o ciclo no qual a fluorescência tornou-se detectável acima da fluorescência de fundo e inversamente proporcional ao logaritmo do número inicial de cópias empregado.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os modelos de aleitamento, higienização e dieta alimentar entre os integrantes do estudo foram avaliados de acordo com o teste exato de Fisher. A distribuição dos diferentes tipos de microrganismos entre as crianças e suas mães foi analisada através do teste de Análise de variância de medidas repetidas para dados categóricos (ANOVAmr), enquanto os níveis salivares de estreptococos cariogênicos em crianças e suas mães foram submetidos á Análise de variância (ANOVA). As condições de saúde bucal das crianças foi avaliada através do teste de Qui-quadrado, enquanto a inter-relação dicotômica entre a ocorrência de cada microrganismo e para cada variável não microbiológica foi realizada através do teste de Mann-Whitney e teste exato de Fisher. As correlações entre os diferentes microrganismos ao longo do período de análise foram determinadas através do teste de correlações de Spearman. Adotou-se o nível de significância para ensaios biológicos com $p < 0,05$.

Resultados

5 Resultados

Para melhor entendimento a apresentação dos resultados foi dividida de acordo com a faixa etária dos bebês que compuseram a amostra.

Foram selecionados 50 bebês na idade de 6 meses, a partir dos critérios estabelecidos na metodologia para a obtenção dos indivíduos da amostra. Posteriormente, parte dessas crianças e seus familiares se mudaram da região de Araçatuba ou acabaram tendo de fazer uso de drogas antimicrobianas e tiveram de ser excluídos da população avaliada. Algumas mães não participaram da pesquisa e também esses dados não puderam ser incluídos quando foram realizadas comparações mães/filhos.

RESULTADOS - 6 MESES DE IDADE

ERUPÇÃO DENTÁRIA E CONDIÇÃO GENGIVAL

Aos 6 meses de idade, todos os bebês participantes da pesquisa apresentaram-se edêntulos (N=50), com rodetes e tecidos moles bucais em condições de normalidade.

HIGIENE BUCAL

Apesar de serem crianças que estavam ingressando no programa educativo-preventivo da Bebê-Clínica da FOA-UNESP, verificamos que 38 mães (76,0%) já realizavam, ou pelo menos assim declaravam, a higienização bucal de seus filhos com gaze ou fralda embebida em água oxigenada diluída ou água morna. Já 24,0% das mães (12) responderam não ter o hábito de higienizar a boca dos bebês. (Gráfico 1). Essa diferença foi estatisticamente significativa (teste de Qui-quadrado, $p < 0,001$).

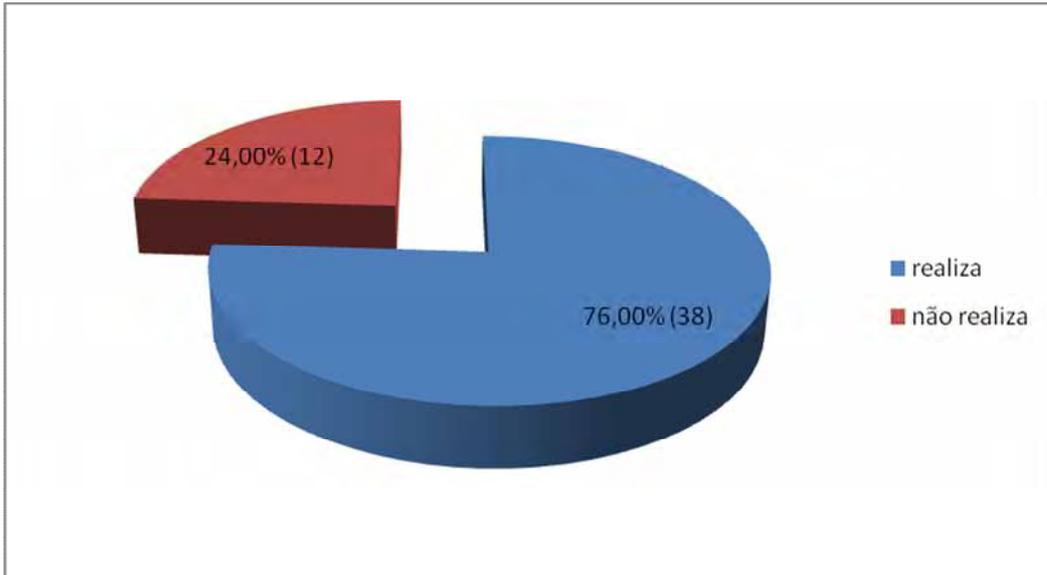


Gráfico 1 - Número e porcentagem de bebês avaliados aos 6 meses de idade, que realizavam higienização bucal.

DIETA ALIMENTAR

Como podemos observar no gráfico 2, apesar de ser preconizado pela OMS (Organização Mundial de Saúde) o aleitamento materno exclusivo até a faixa etária de 6 meses de idade, foi verificado neste estudo que apenas 36,0% dos bebês (18) eram amamentados exclusivamente no peito, 38,0% das crianças (19) eram alimentadas com mamadeira, e 26,0% com mamadeira (13), juntamente com aleitamento materno (Gráfico 2). Esses três padrões de dieta alimentar, aos seis meses de idade, foram semelhantes em termos de distribuição na população estudada (teste Qui-quadrado, $p= 0,805$).

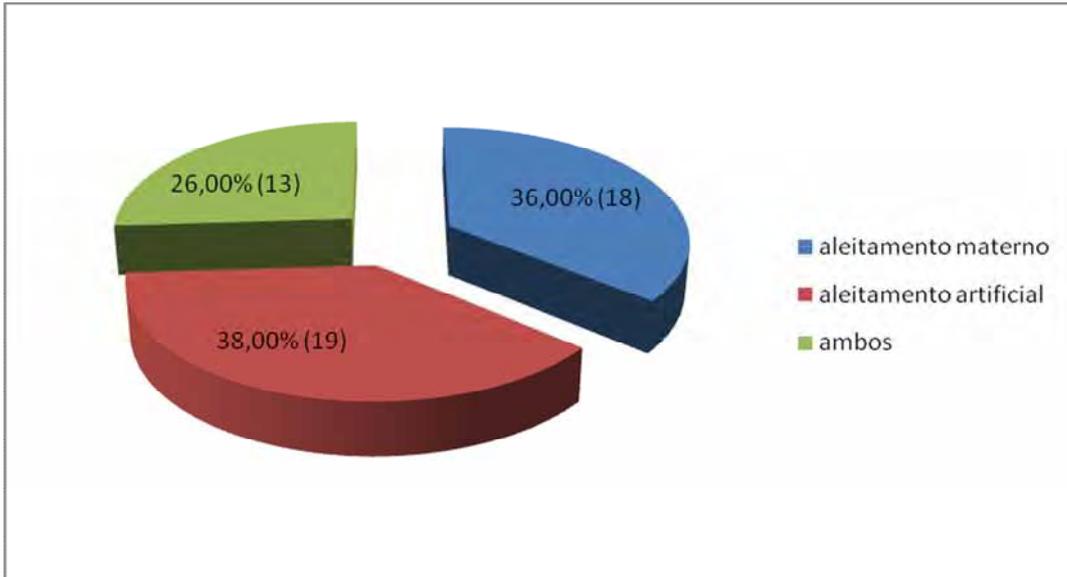


Gráfico 2 - Número e porcentagem de bebês avaliados aos 6 meses de idade, quanto ao tipo de aleitamento.

Com relação aos hábitos alimentares noturnos, das 48 crianças avaliadas, 18 (36,0%) apresentavam o hábito de acordar para mamar e dormir mamando, 22 (44,0%) acordavam para mamar, 7 (14,0%) dormiam mamando e 3 (6%) não possuíam o hábito de alimentação noturna (gráfico 3). Os dados mostram que, aos seis meses, estas diferenças foram consideradas significantes estatisticamente (teste de Qui-quadrado, $p < 0,001$) (Gráfico 3).

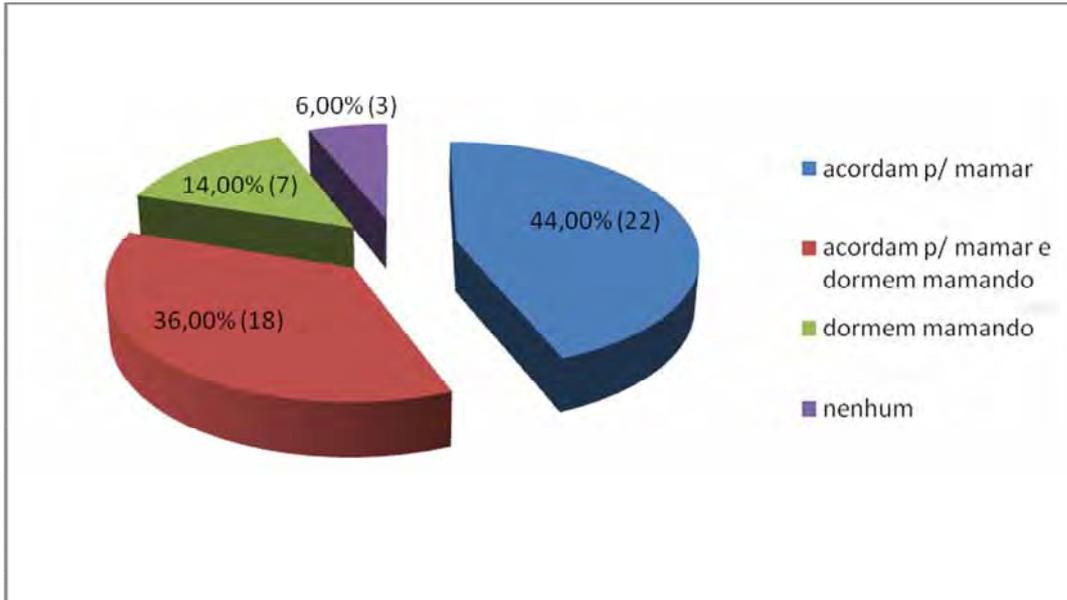


Gráfico 3 - Número e porcentagem de bebês avaliados aos 6 meses de idade, quanto ao tipo de aleitamento noturno.

PREVALÊNCIA DE CÁRIE DENTÁRIA

Por tratarem-se de crianças edêntulas, neste período de avaliação, não houve registro de ocorrência de cárie dentária.

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Os dados obtidos com o PCR apresentaram maior reprodutibilidade do que os oriundos de cultura (Tabela 3), além de uma maior sensibilidade. Inicialmente, alguns amplicons foram purificados e submetidos à seqüenciamento para confirmar a identidade dos mesmos e a especificidade dos iniciadores e da própria reação de amplificação do DNA que foi utilizada.

Através de análise de variância de medidas repetidas para dados categóricos (ANOVA_{mr}), tanto para os dados iniciais de cultura quanto os obtidos com PCR (Tabela 4), observou-se que a ocorrência de todos os microrganismos alvo apresentaram maior freqüência de detecção na saliva das mães, com exceção de *Fusobacterium periodonticum*, o qual foi raramente detectado tanto em crianças quanto nas suas mães, e *Treponema denticola*. Os valores de significância variaram entre os extremos, de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ($p=0,033$) para *Streptococcus mutans* ($p < 0,001$). Os microrganismos mais freqüentemente

detectados nessa fase inicial do estudo pertenciam ao gênero *Actinomyces*, *C. rectus* e à espécie *Fusobacterium nucleatum*.

Através do teste de correlações de Spearman, verificou-se que a distribuição dos microrganismos estudados apresentou relação positiva entre mães e crianças.

Tabela 3 - Ocorrência dos principais microrganismos bucais associados à cárie e doenças periodontais na saliva de crianças com 6 meses de idade e suas mães. Resultados obtidos por cultura (N=50).

Microrganismo	Ocorrência N (%)	
	Crianças 6 meses	Mães
<i>Actinomyces</i> sp.	3 (6,0)	25 (50,0)
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	1 (2,0)	9 (18,0)
<i>Campylobacter rectus</i>	8 (16,0)	15 (30,0)
<i>Eikenella corrodens</i>	4 (8,0)	18 (36,0)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	7 (14,0)	29 (58,0)
<i>F. periodonticum</i>	0 (0,0)	3 (6,0)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	2 (4,0)	8 (16,0)
<i>Prevotella intermedia-nigrescens</i>	4 (8,0)	20 (40,0)
<i>S. mutans</i>	2 (4,0)	50 (100,0)
<i>S. sobrinus</i>	1 (2,0)	32 (64,0)

Tabela 4 - Ocorrência dos principais microrganismos bucais associados à cárie e doenças periodontais na saliva de crianças com 6 meses de idade e suas mães. Resultados obtidos por PCR (N=50).

Microrganismo	Ocorrência N (%)	
	Crianças	Mães
<i>Actinomyces</i> sp.	8 (16,0)	28 (56,0)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	2 (4,0)	7 (14,0)
<i>C. rectus</i>	13 (26,0)	15 (30,0)
<i>E. corrodens</i>	4 (8,0)	20 (40,0)
<i>F. nucleatum</i>	9 (18,0)	29 (58,0)
<i>P. gingivalis</i>	4 (8,0)	8 (16,0)
<i>P. intermedia</i>	6 (12,0)	22 (44,0)
<i>S. mutans</i>	4 (8,0)	50 (100,0)
<i>S. sobrinus</i>	1 (2,0)	34 (68,0)
<i>T. forsythia</i>	0 (0,0)	9 (18,0)
<i>T. denticola</i>	0 (0,0)	3 (6,0)

Os dados obtidos com PCR e apresentados na Tabela 4 apresentaram correspondência aos dados de cultura obtidos inicialmente, além de maior reprodutibilidade. Através desses resultados, verificou-se que os bebês apresentam uma microbiota, mesmo que transitória, complexa e quando a criança alberga um determinado microrganismo, a probabilidade da mãe também albergá-lo na cavidade bucal foi superior a 80%, segundo o teste de correlação acima mencionado.

A contaminação microbiana na saliva das mães se mostrou bastante semelhante à microbiota do biofilme. Na tabela 5 são apresentados os dados de cultura e PCR relativos ao biofilme microbiano das mães das crianças examinadas.

Não foram observadas quaisquer influências do tipo de dieta alimentar, hábitos alimentares noturnos, características de higienização das crianças e a microbiota observada nas Tabelas 3 e 4, sendo que através do teste exato de Fisher os valores de significância variaram de $p= 0,435$ a $p= 1,0$.

Através de real-time PCR foram calculados os níveis salivares médios de estreptococos cariogênicos. Nas amostras positivas para *S. mutans*, nos bebês, os níveis foram de $3,01.10^2 \pm 1,3.10^2$ cópias do DNA alvo por mililitro de saliva, enquanto nas mães colonizadas por esses cocos os valores foram, em média

$7,6.10^4 \pm 6,5.10^4$ cópias do DNA alvo por mililitro de saliva não estimulada. Os níveis salivares desses microrganismos foram, aos seis meses de idade dos bebês, significativamente mais elevados nas mães (ANOVA, $p= 0,021$).

Para *S. sobrinus* o mesmo foi observado, mas a única amostra de criança positiva aos 6 meses albergou $1,02.10^2$ cópias do DNA alvo por mililitro de saliva. Nas mães, esses cocos atingiram uma média de $8,06.10^3 \pm 7,51.10^3$, níveis significativamente mais elevados do que os observados com o único bebê que mostrou albergar esse microrganismo (ANOVA, $p= 0,007$).

Tabela 5 - Ocorrência dos principais microrganismos bucais associados à cárie e doenças periodontais no biofilme das mães (N=50). Resultados obtidos por cultura e PCR.

Microrganismo	Ocorrência N(%)	
	Cultura	PCR
<i>Actinomyces</i> sp.	22 (44,0)	31 (62,0)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	12 (24,0)	12 (24,0)
<i>C. rectus</i>	22 (44,0)	26 (52,0)
<i>E. corrodens</i>	22 (44,0)	20 (40,0)
<i>F. nucleatum</i>	37 (74,0)	31 (62,0)
<i>F. periodonticum</i>	3 (6,0)	- ¹
<i>P. gingivalis</i>	13 (26,0)	9 (18,0)
<i>P. intermedia-nigrescens</i> ²	25 (50,0)	- ²
<i>P. intermedia</i>	- ³	25 (50,0)
<i>S. mutans</i>	50 (100,0)	50 (100,0)
<i>S. sobrinus</i>	33 (66,0)	38 (76,0)
<i>T. forsythia</i>	0 (0,0)	9 (18,0)
<i>T. denticola</i>	0 (0,0)	5 (10,0)

¹Não avaliado por PCR

²*P. intermedia-nigrescens* é o termo utilizado quando esses microrganismos são cultivados, pela impossibilidade de se diferenciar *P. intermedia* de *P. nigrescens* através de testes fenotípicos

³Incluídos dentro da denominação *P. intermedia-nigrescens*

RESULTADOS - 12 MESES DE IDADE

Nesta fase de reagendamento dos pacientes, cinco crianças foram excluídas da pesquisa, por motivo de mudança de cidade, totalizando então 45 crianças na amostra, mas as amostras de saliva e biofilme de três bebês foram acidentalmente contaminadas no laboratório nas semanas seguintes à coleta e não foi possível recuperar o material clínico em função do tempo que havia se passado, de forma que a análise microbiológica foi realizada com 42 crianças e suas mães, sendo que os parâmetros clínicos foram comparados com 45 crianças, enquanto que os parâmetros microbiológicos foram comparados com 42 pares de crianças e mães.

ERUPÇÃO DENTÁRIA E CONDIÇÃO GENGIVAL

Neste período de avaliação, todos os 45 pacientes apresentavam dentes erupcionados. Na tabela 6, verificamos, nas crianças avaliadas, a variação de dentes erupcionados.

Tabela 6 - Variação de dentes erupcionados nas crianças avaliadas aos 12 meses de idade.

Nº crianças*	Nº de dentes erupcionados
8	Até 2 dentes erupcionados
15	3 a 5 dentes erupcionados
19	6 a 8 dentes erupcionados
3	9 a 10 dentes erupcionados

*N = 45

À análise dos tecidos gengivais, pode-se verificar que os mesmos encontravam-se em padrões de normalidade, com relação a inserção, textura e coloração.

HIGIENE BUCAL

Quanto à higiene bucal, esta era realizada com gaze e água oxigenada ou água, em 19 crianças (42,22%), uma vez ao dia, em 16 (35,55%), duas vezes ao dia, em 9 (20%), três ou mais vezes ao dia, e em uma criança (2,22%), raramente (Gráfico 4).

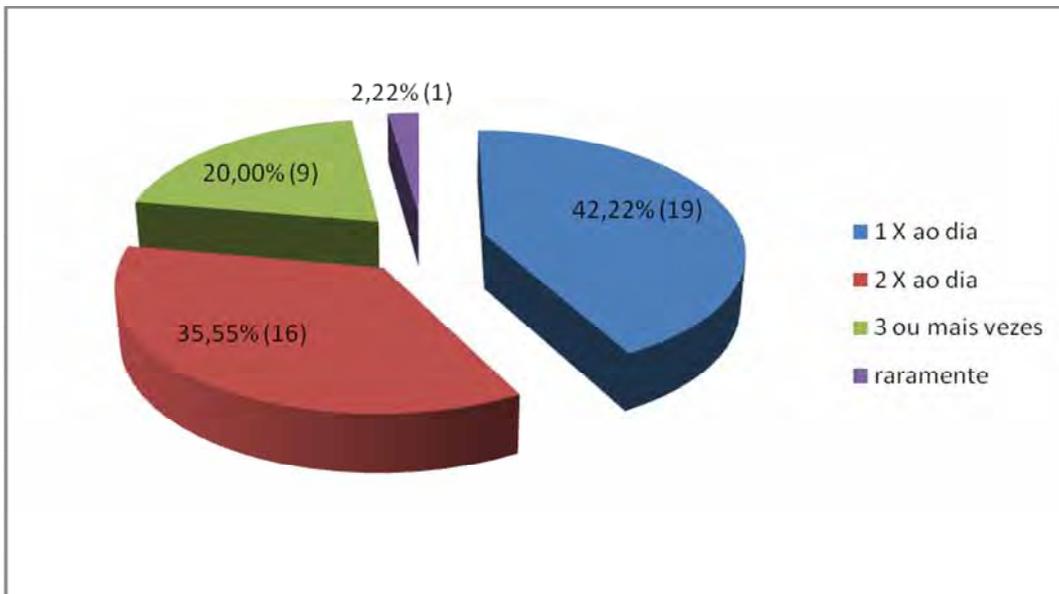


Gráfico 4 - Número e porcentagem de bebês avaliados aos 12 meses de idade, com relação a freqüência de higienização bucal.

DIETA ALIMENTAR

Com relação a ingestão de alimentos cariogênicos, todas as crianças nesta fase da pesquisa, segundo a avaliação dos diários alimentares, apresentavam padrão de consumo moderado.

Prevalência de Cárie dentária

Neste período de avaliação, após exame clínico detalhado, foi possível verificar que, todos os dentes dos 45 pacientes examinados apresentavam-se hígidos.

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Ao contrário das mães, em que 83% dos casos o microrganismo detectado em uma coleta também foi detectado na coleta seguinte, entre os bebês a detecção por cultura de um microrganismo em duas coletas subseqüentes foi de apenas 29%, subindo para 44% com auxílio do PCR. Assim, os dados referentes às coletas dos 12, 18 e 24 meses foram obtidos com PCR ou real-time PCR.

Através dos dados obtidos com a saliva dos bebês aos 12 meses, quando comparados com os dados da Tabela 4, verifica-se que nenhum microrganismo

sofreu modificações estatisticamente significativas, com exceção de *Eikenella corrodens*, a qual teve sua ocorrência aumentada nos bebês aos 12 meses de idade (ANOVA_{mr}, $p=0,046$), como observado na Tabela 7.

Tabela 7 - Ocorrência dos principais microrganismos bucais associados à cárie e doenças periodontais na saliva de crianças com 12 meses de idade e suas mães (N= 42).

Microrganismo	Ocorrência N (%)	
	Crianças	Mães
<i>Actinomyces</i> sp.	13 (30,95)	27 (64,28)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	3 (7,14)	8 (19,04)
<i>C. rectus</i>	10 (23,80)	16 (38,09)
<i>E. corrodens</i>	8 (19,04)	20 (47,61)
<i>F. nucleatum</i>	10 (23,80)	27 (64,28)
<i>P. gingivalis</i>	3 (7,14)	8 (19,04)
<i>P. intermedia</i>	7 (16,66)	19 (45,23)
<i>S. mutans</i>	5 (11,90)	41 (97,61)
<i>S. sobrinus</i>	2 (4,76)	26 (61,90)
<i>T. forsythia</i>	0 (0,0)	7 (16,66)
<i>T. denticola</i>	0 (0,0)	3 (7,14)

Através de análise de variância de medidas repetidas para dados categóricos, verificou-se que aos 12 meses a presença desses mesmos microrganismos na saliva das crianças e mães foi similar à observada aos 6 meses, sendo que as diferenças entre a microbiota materna e dos bebês se mantiveram.

Como também observado no primeiro período de avaliação, a microbiota presente na saliva das mães foi mais complexa e a prevalência dos microrganismos estudados, com exceção de *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, foi estatisticamente mais elevada nas mães do que nos bebês. Quanto ao conjunto de microrganismos presentes no biofilme dental coletado, pode-se verificar a estabilidade da colonização microbiana nas mães (Tabela 8).

Tabela 8 - Ocorrência dos principais microrganismos bucais associados à cárie e doenças periodontais no biofilme de crianças (N=42) com 12 meses de idade e suas mães (N= 42).

Microrganismo	Ocorrência N (%)	
	Crianças	Mães
<i>Actinomyces</i> sp.	14 (33,33)	27 (64,28)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	3 (7,14)	10 (23,80)
<i>C. rectus</i>	9 (21,42)	20 (47,61)
<i>E. corrodens</i>	7 (16,66)	18 (42,85)
<i>F. nucleatum</i>	10 (23,80)	24 (57,14)
<i>P. gingivalis</i>	2 (4,76)	8 (19,04)
<i>P. intermedia</i>	8 (19,04)	20 (47,61)
<i>S. mutans</i>	6 (14,28)	42 (100,0)
<i>S. sobrinus</i>	2 (4,76)	29 (69,04)
<i>T. forsythia</i>	0 (0,0)	8 (19,04)
<i>T. denticola</i>	0 (0,0)	6 (14,28)

Aos 12 meses, não foram observadas quaisquer influências do tipo de dieta alimentar, características de higienização das crianças e a microbiota observada nas Tabelas 7 e 8, sendo que, através do teste exato de Fisher, os valores de significância variaram de $p=0,317$ a $p=1,0$.

Através de real-time PCR foram calculados os níveis salivares médios de estreptococos cariogênicos das crianças e mães aos 12 meses. Nas amostras positivas para *S. mutans*, nos bebês, os níveis foram de $4,06 \cdot 10^2 \pm 2,3 \cdot 10^2$ cópias do DNA alvo por mililitro de saliva não estimulada, enquanto nas mães colonizadas por esses cocos os valores foram, em média $5,9 \cdot 10^4 \pm 4,8 \cdot 10^4$ cópias do DNA alvo por mililitro de saliva não estimulada. Os níveis salivares desses microrganismos foram, aos doze meses de idade dos bebês, significativamente mais elevados nas mães (ANOVA, $p=0,032$).

Para *S. sobrinus* o mesmo foi observado, mostrando $2,1 \cdot 10^2 \pm 8,1 \cdot 10^2$ cópias do DNA alvo por mililitro de saliva, atingindo uma média de $5,5 \cdot 10^3 \pm 4,8 \cdot 10^3$ cópias do DNA alvo por mililitro de saliva nas mães, níveis significativamente mais elevados do que os observados com os bebês (ANOVA, $p=0,016$).

O único fator que afetou significativamente a ocorrência dos estreptococos cariogênicos foi o número de dentes erupcionados, os quais foram mais elevados em crianças que apresentavam seis ou mais dentes decíduos erupcionados (teste de Mann-Whitney, $p= 0,033$), embora os níveis salivares desses microrganismos não tenha sido afetado na mesma extensão (ANOVA, $p= 0,156$).

RESULTADOS - 18 MESES DE IDADE

Nesta fase de reagendamento dos pacientes, oito crianças foram excluídas da pesquisa, por motivo de mudança de cidade ou utilização prolongada de antimicrobianos, totalizando então 37 crianças na amostra. Para a análise microbiológica, quatro mães não compareceram ao reagendamento e os dados expressos se referem a 33 mães e 37 crianças.

Nos casos em que os dados microbiológicos das crianças eram comparados com os de suas progenitoras, as crianças cujas mães não puderam participar do reagendamento tiveram seus dados excluídos desses testes.

ERUPÇÃO DENTÁRIA E CONDIÇÃO GENGIVAL

Na tabela 9, podemos verificar o número de dentes erupcionados nas crianças avaliadas nesta faixa etária:

Tabela 9 - Variação de dentes erupcionados nas crianças avaliadas aos 18 meses de idade.

Nº crianças*	Nº de dentes erupcionados
9	até 10 dentes erupcionados
28	11 a 20 dentes erupcionados

*N = 37

Neste período, da mesma forma que no período anterior, os tecidos gengivais encontravam-se em padrão de normalidade em todos os pacientes avaliados, pelos critérios propostos. O número de crianças com pelo menos 11 dentes erupcionados aos 18 meses de idade foi estatisticamente superior ao número de crianças com menos de 11 dentes (teste de Mann-Whitney, $p= 0,036$).

HIGIENE BUCAL

Neste período de avaliação, as mães ainda realizavam a higienização bucal de seus filhos com gaze e água oxigenada, ou água morna, como observado no período anterior. Dos 37 pacientes avaliados na faixa etária de 18 meses de idade, com relação à realização da higiene bucal, apenas um paciente não a realizava freqüentemente. Em dezessete crianças a higienização bucal era realizada com gaze e água oxigenada duas vezes ao dia. Em dez crianças, era realizada de três ou mais vezes ao dia, e em nove, uma vez ao dia (Gráfico 5). O grupo de crianças que recebia higienização com freqüência de duas vezes ao dia foi estatisticamente maior do que os demais (teste de Qui-quadrado, $p= 0,041$).

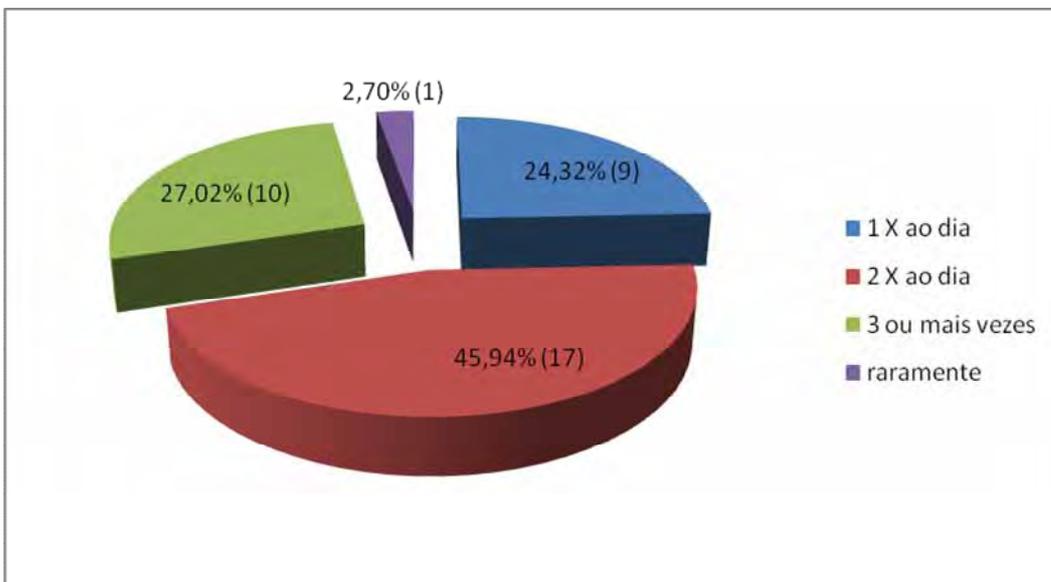


Gráfico 5 - Número e porcentagem de bebês avaliados aos 18 meses de idade, com relação a freqüência de higienização bucal.

DIETA ALIMENTAR

Nesta faixa etária verificou-se em duas crianças alteração para o padrão de consumo de moderado para alto de alimentos cariogênicos, sendo que as outras crianças permaneceram no padrão moderado (Gráfico 6). Essa diferença foi estatisticamente significativa (teste de Qui-quadrado, $p<0,001$).

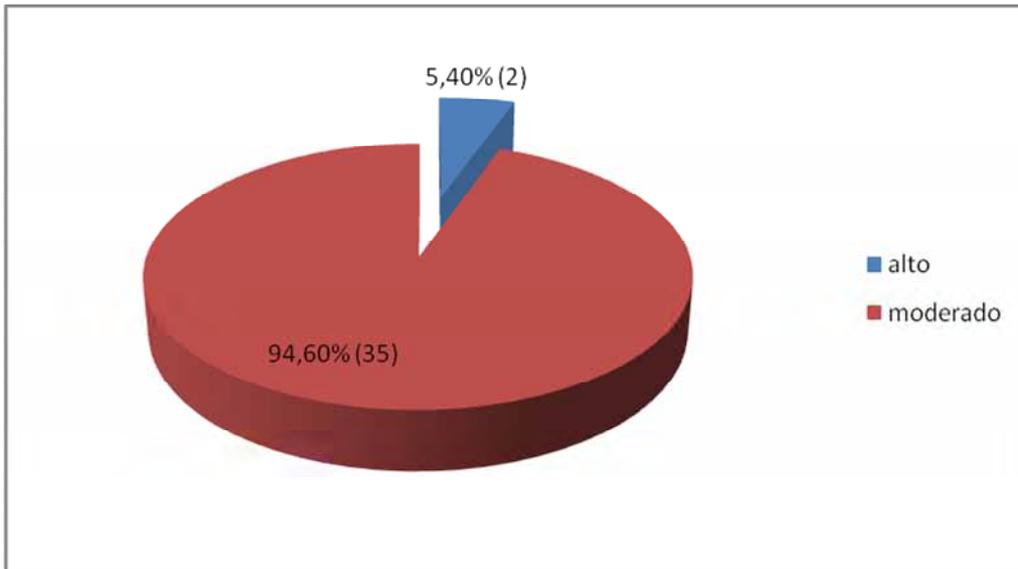


Gráfico 6 - Número e porcentagem de bebês avaliados aos 18 meses de idade, com relação ao padrão de consumo de alimentos açucarados.

PREVALÊNCIA DE CÁRIE DENTÁRIA

Nesta terceira etapa, após profilaxia e posterior exame clínico dos bebês envolvidos, verificou-se que dois pacientes (5,4%) apresentavam lesão de cárie ativa, na forma de mancha branca. Essas lesões cariosas foram observadas no incisivo central superior, na região cervical da superfície vestibular. Em função do número de crianças estudadas, a presença de cárie não diferiu da observada nas crianças com 12 meses de idade (teste exato de Fisher, $p=0,342$) (Gráfico 7).

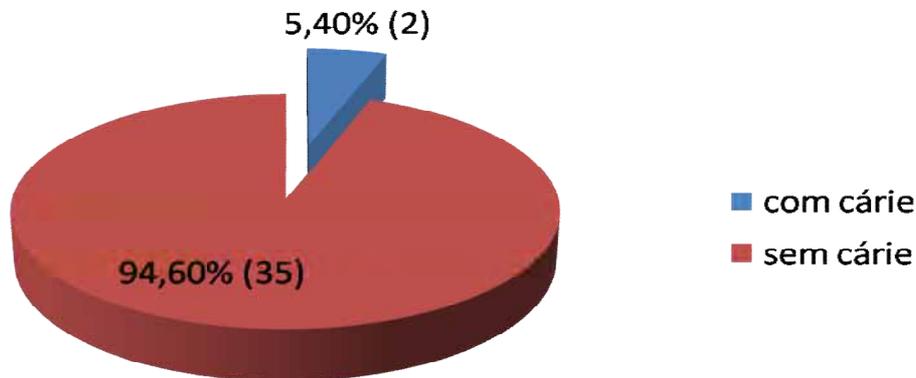


Gráfico 7 - Número e porcentagem de bebês avaliados aos 18 meses de idade, quanto a prevalência de lesão de cárie dentária.

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Quando comparados com os dados da contaminação microbiana presente na saliva de crianças com 6 meses de idade, os dados apresentados na Tabela 10 evidenciam um aumento significativo na prevalência de *Actinomyces* sp. (ANOVA_{mr}, $p=0,015$), *Eikenella corrodens* (ANOVA_{mr}, $p=0,005$), *Fusobacterium nucleatum* (ANOVA_{mr}, $p=0,007$), *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* (ANOVA_{mr}, $p= 0,044$; ANOVA_{mr}, $p= 0,028$, respectivamente), enquanto que a mesma comparação com a contaminação salivar das crianças com 12 meses revelou uma elevação na prevalência de *Actinomyces* sp. (ANOVA_{mr}, $p=0,012$), *Fusobacterium nucleatum* (ANOVA_{mr}, $p=0,029$) e *S. sobrinus* ANOVA_{mr}, $p= 0,036$.

Quando os dados da contaminação salivar das mães é comparada à observada nas crianças, aos 18 meses de idade, verifica-se que a ocorrência de quase todas as espécies microbianas estudadas se mostra mais elevada nas mães, com exceção de *Fusobacterium nucleatum*, o qual já atingiu a prevalência característica das mães (ANOVA_{mr}, $p= 0,058$), e de *Treponema denticola*, em que a prevalência em mães e filhos foi similar e bastante modesta (Tabela 10).

Tabela 10 - Ocorrência dos principais microrganismos bucais associados à cárie e doenças periodontais na saliva de crianças com 18 meses de idade e suas mães (N= 33).

Microrganismo	Ocorrência N (%)	
	Crianças N=37	Mães N=33
<i>Actinomyces</i> sp.	13 (35,13)	20 (60,60)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	2 (5,40)	6 (18,18)
<i>C. rectus</i>	9 (24,32)	14 (42,42)
<i>E. corrodens</i>	9 (24,32)	19 (57,57)
<i>F. nucleatum</i>	17 (45,94)	20 (60,60)
<i>P. gingivalis</i>	3 (8,10)	7 (21,21)
<i>P. intermedia</i>	7 (18,91)	17 (51,51)
<i>S. mutans</i>	6 (16,21)	33 (100,0)
<i>S. sobrinus</i>	4 (10,81)	20 (60,60)
<i>T. forsythia</i>	1 (2,7)	6 (18,18)
<i>T. denticola</i>	0 (0,0)	2 (6,06)

No que concerne o biofilme bucal, os dados da Tabela 11 mostram um aumento significativo na prevalência de *Actinomyces* sp. (ANOVA_{mr}, P=0,007), e *Fusobacterium nucleatum* (ANOVA_{mr}, p= 0,028) quando o biofilme das crianças com 18 meses é comparado com a microbiota das crianças aos 12 meses de idade. Contudo, a ocorrência desses microrganismos nas crianças de 18 meses quando comparada com os dados das mesmas crianças aos 12 meses de idade evidencia que, na maioria dos indivíduos, o microrganismo que havia sido detectado no exame microbiológico anterior não colonizava mais a cavidade bucal da criança, sugerindo presença transitória desses microrganismos.

Aos 18 meses, não foram observadas quaisquer influências do tipo de dieta alimentar, características de higienização das crianças e ocorrência dos microrganismos alvo apresentados nas Tabelas 10 e 11, sendo que, através do teste exato de Fisher, os valores de significância variaram de p= 0,213 a p=1,0. Os níveis mais elevados de cocos cariogênicos na saliva foram observados em duas crianças com registro de lesão de cárie dentária e com histórico de dieta alimentar com padrão de consumo alto de alimentos cariogênicos.

Nessas crianças, a somatória de *S. mutans* e *S. sobrinus* foi $4,5.10^3 \pm 2,3.10^3$ cópias do DNA alvo por mililitro de saliva, significativamente mais elevado do que observado para as outras em que esses microrganismos também foram quantificados por real-time PCR (ANOVA, $p= 0,027$).

Tabela 11 - Ocorrência dos principais microrganismos bucais associados à cárie e doenças periodontais no biofilme de crianças (N=37) com 18 meses de idade e suas mães (N= 33).

Microrganismo	Ocorrência N (%)	
	Crianças N=37	Mães N= 33
<i>Actinomyces</i> sp.	12 (32,43)	22 (66,66)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	2 (5,40)	8 (24,24)
<i>C. rectus</i>	11 (29,72)	14 (42,42)
<i>E. corrodens</i>	10 (27,02)	19 (57,57)
<i>F. nucleatum</i>	18 (48,64)	21 (63,63)
<i>P. gingivalis</i>	3 (8,10)	8 (24,24)
<i>P. intermedia</i>	7 (18,91)	19 (57,57)
<i>S. mutans</i>	6 (16,21)	37 (100,0)
<i>S. sobrinus</i>	3 (8,10)	24 (72,72)
<i>T. forsythia</i>	1 (2,70)	8 (24,24)
<i>T. denticola</i>	0 (0,0)	3 (9,09)

Através de real-time PCR foram calculados os níveis salivares médios de estreptococos cariogênicos das crianças e mães aos 18 meses. Nas amostras positivas para *S. mutans*, nos bebês, os níveis foram de $3,22.10^2 \pm 8,01.10^2$ cópias do DNA alvo por mililitro de saliva não estimulada, enquanto nas mães colonizadas por esses cocos os valores foram, em média $7,55.10^4 \pm 5,11.10^4$ cópias do DNA alvo por mililitro de saliva não estimulada. Os níveis salivares desses microrganismos foram, aos dezoito meses de idade dos bebês, significativamente mais elevados nas mães (ANOVA, $p= 0,022$).

Para *S. sobrinus* o mesmo foi observado, mostrando $4,1.10^2 \pm 1,9.10^2$ cópias do DNA alvo por mililitro de saliva, atingindo uma média de $6,02.10^3 \pm 3,8.10^3$ cópias do DNA alvo por mililitro de saliva nas mães, níveis significativamente mais elevados do que os observados com os bebês (ANOVA, $p= 0,028$).

RESULTADOS OBTIDOS AOS 24 MESES DE IDADE
ERUPÇÃO DENTÁRIA E CONDIÇÃO GENGIVAL

Neste período, da mesma forma que nos períodos anteriores, os tecidos gengivais apresentavam padrão de normalidade em todos os pacientes avaliados.

A tabela 12 apresenta o número de crianças avaliadas com os respectivos números de dentes irrompidos.

Tabela 12 - Variação no número de dentes erupcionados nas crianças avaliadas aos 24 meses de idade.

Nº crianças*	Nº de dentes erupcionados
4	10 a 14 dentes erupcionados
22	16 a 17 dentes erupcionados
11	20 dentes erupcionados

*N= 37

HIGIENE BUCAL

Neste período, todos os pacientes avaliados já utilizavam escova e creme dental para realizar a higiene bucal. Dos 37 pacientes avaliados nesta faixa etária, em nove, a higiene bucal era realizada uma vez ao dia, em dezoito crianças era realizada duas vezes ao dia, e em dez, era realizada três ou mais vezes ao dia (Gráfico 8).

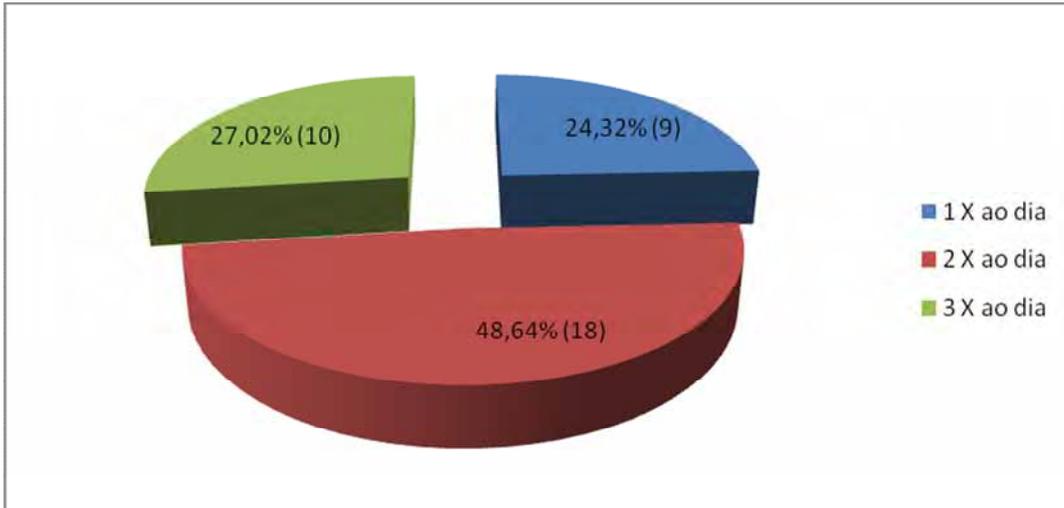


Gráfico 8 - Número e porcentagem de crianças avaliadas aos 24 meses de idade, relacionadas com o número de vezes que realizavam a higiene bucal.

DIETA ALIMENTAR

O padrão de consumo de alimentos cariogênicos foi, neste período, considerado moderado em 35 crianças (94,60%), e alto em duas crianças (5,40%), mantendo os resultados do período anterior (Gráfico 9).

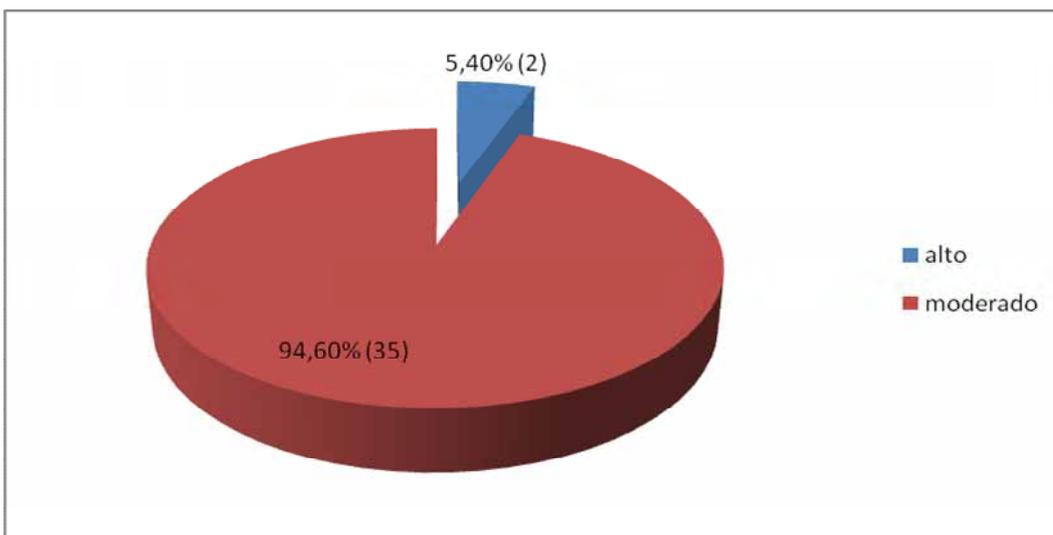


Gráfico 9 - Número e porcentagem de crianças avaliadas aos 24 meses de idade, com relação ao padrão de consumo de alimentos açucarados.

PREVALÊNCIA DE CÁRIE DENTÁRIA

Após profilaxia e posterior exame clínico dos bebês, verificou-se que três pacientes (8,10%) apresentavam lesão de cárie ativa. Um dos pacientes apresentava lesões, na forma de mancha branca no incisivo central superior, na região cervical da superfície vestibular. Em outra criança as mesmas lesões foram verificadas nos dentes 51 e 61, além de haver envolvimento do 52 e 62 que apresentava lesão de cárie de esmalte com cavitação. O terceiro bebê apresentava além de lesão de cárie em esmalte sem cavitação (mancha branca) nos dentes 51 e 61, envolvimento cariioso no dente 84, na forma cavitada na superfície oclusal. Duas destas crianças, que apresentavam lesões cariosas, eram as mesmas em que foram observadas as lesões no período anterior.

Em função do número de crianças que desenvolveram cárie e do número total de crianças do estudo, verificou-se que não existiu diferença estatisticamente significativa entre a ocorrência de cárie aos 18 e 24 meses do estudo (teste exato de Fisher, $p= 0,125$). (Gráfico 10)

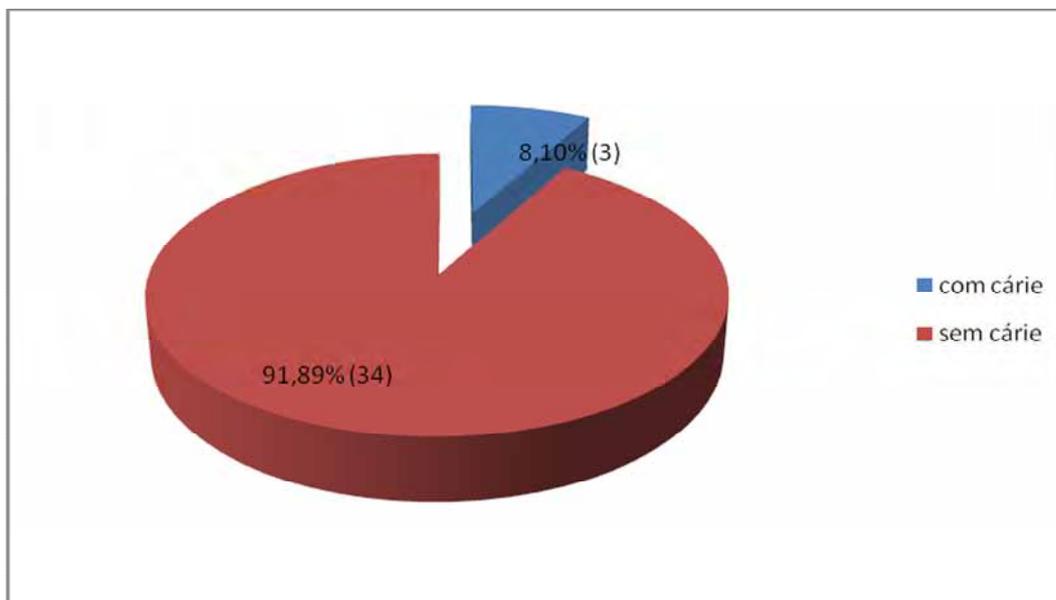


Gráfico 10 - Número e porcentagem de crianças avaliadas aos 24 meses de idade, relacionadas com a prevalência de lesão de cárie dentária.

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

A avaliação microbiológica aos 24 meses foi concluída com 37 crianças e 30 mães, visto que não foi possível coletar os espécimes clínicos de sete mães, que não puderam comparecer ao reagendamento na Bebê-Clínica.

A contaminação salivar aos 24 meses mostrou-se bastante semelhante à observada aos 18 meses de idade das crianças, com exceção de *S. mutans* (ANOVA_{mr}, $p=0,033$) e *S. sobrinus* (ANOVA_{mr}, $p=0,01$), os quais tiveram a sua prevalência significativamente aumentada nesse período. A contaminação salivar das mães mostrou uma prevalência mais elevada de quase todos os microrganismos anaeróbios e microaerófilos bucais, quando comparada com a prevalência desses microrganismos na saliva das crianças, como também observado aos 18 meses, com exceção de *Fusobacterium nucleatum*, que atingiu uma colonização mais estável, em que mais de 70% das crianças que o albergavam aos 18 meses continuaram a apresentá-lo aos 24 meses, como ocorria com as mães, e também *Treponema denticola*, o qual não foi freqüente desde o início do experimento, tanto para mães quanto para as crianças (Tabela 13).

Tabela 13 - Ocorrência dos principais microrganismos bucais associados à cárie e doenças periodontais na saliva de crianças (N=37) com 24 meses de idade e suas mães (N= 30).

Microrganismo	Ocorrência N (%)	
	Crianças N=37	Mães N=30
<i>Actinomyces</i> sp.	18 (48,64)	20 (66,66)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	1 (2,70)	5 (16,66)
<i>C. rectus</i>	11 (29,72)	13 (43,33)
<i>E. corrodens</i>	10 (27,02)	13 (43,33)
<i>F. nucleatum</i>	19 (51,35)	18 (60,0)
<i>P. gingivalis</i>	3 (8,10)	7 (23,33)
<i>P. intermedia</i>	6 (16,21)	14 (46,66)
<i>S. mutans</i>	11 (29,72)	30 (100,0)
<i>S. sobrinus</i>	8 (21,62)	17 (56,66)
<i>T. forsythia</i>	0 (0,0)	5 (16,66)
<i>T. denticola</i>	0 (0,0)	2 (6,66)

Aos 24 meses de idade, a distribuição dos diferentes microrganismos na saliva refletiu a microbiota presente no biofilme microbiano. Verificou-se que, com exceção de *F. nucleatum*, a distribuição dos diferentes microrganismos de relevância para as doenças periodontais e cárie foi significativamente menor nas crianças do que nas mães (Tabela 14).

Além desse aspecto, entre os 6 e 24 meses de idade, a prevalência de *S. mutans* e *S. sobrinus* na saliva aumentou 3,75 vezes e 10,81 vezes, respectivamente, sendo que entre os 18 e 24 foi o período de maior elevação da prevalência desses cocos, correspondendo também ao período de maior número de dentes decíduos erupcionados e dieta alimentar mais variada com maior quantidade de alimentos cariogênicos.

Tabela 14 - Ocorrência dos principais microrganismos bucais associados à cárie e doenças periodontais no biofilme de crianças (N=37) com 24 meses de idade e suas mães (N= 30).

Microrganismo	Ocorrência N (%)	
	Crianças N=37	Mães N=30
<i>Actinomyces</i> sp.	21 (56,75)	20 (66,66)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	3 (8,10)	7 (23,33)
<i>C. rectus</i>	13 (35,13)	14 (46,66)
<i>E. corrodens</i>	9 (24,32)	17 (56,66)
<i>F. nucleatum</i>	19 (51,35)	18 (60,0)
<i>P. gingivalis</i>	4 (10,81)	7 (23,33)
<i>P. intermedia</i>	7 (18,91)	15 (50,0)
<i>S. mutans</i>	11 (29,72)	30 (100,0)
<i>S. sobrinus</i>	8 (21,62)	19 (63,33)
<i>T. forsythia</i>	2 (5,40)	7 (23,33)
<i>T. denticola</i>	0 (0,0)	3 (10,0)

O biofilme microbiano mostrou que a presença de alguns microrganismos periodontais, como *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *A. actinomycetemcomitans*, é bastante modesta até os 24 meses de idade e essa baixa prevalência também mostrou correlação estatística com a prevalência desses microrganismos na microbiota das mães (Correlação de Spearman, $P < 0,001$, para todos esses microrganismos). Enquanto outros, como *F. nucleatum*, são freqüentes na microbiota bucal de crianças nessa faixa etária, outros microrganismos se encontrariam em uma condição intermediária, como *S. mutans*, *S. sobrinus*, *P. intermedia*, *C. rectus*. A presença desses microrganismos não foi estatisticamente associada à dieta alimentar ou higiene ao qual as crianças eram submetidas, mas o aumento do número de dentes erupcionados foi fator mais significativo na colonização da cavidade bucal (Teste de Qui-Quadrado, $p = 0,034$).

Aos vinte e quatro meses de idade, através de real-time PCR, verificou-se que os níveis de estreptococos cariogênicos mantiveram-se relativamente baixos em todas as crianças que não apresentavam manchas brancas, e significativamente mais elevados nas mães. Nas amostras positivas para *S. mutans*, nos bebês, os níveis foram de $1,9.10^2 \pm 2,2.10^2$ cópias do DNA alvo por mililitro de saliva não

estimulada, enquanto nas mães colonizadas por esses cocos os valores foram, em média $4,81.10^4 \pm 3,6.10^4$ cópias do DNA alvo por mililitro de saliva não estimulada (ANOVA, $p= 0,018$). Para *S. sobrinus* o mesmo foi observado, mostrando $1,1.10^2 \pm 1,3.10^2$ cópias do DNA alvo por mililitro de saliva, atingindo uma média de $7,3.10^3 \pm 5,5.10^3$ cópias do DNA alvo por mililitro de saliva nas mães, níveis significativamente mais elevados do que os observados com os bebês (ANOVA, $p= 0,041$).

As crianças com cárie dentária continuaram a apresentar níveis salivares mais elevados de estreptococos cariogênicos. Nessas crianças, a somatória de *S. mutans* e *S. sobrinus* foi $6,02.10^3 \pm 4,78.10^3$ cópias do DNA alvo por mililitro de saliva, significativamente mais elevado do que observado para as outras crianças em que esses microrganismos também foram quantificados por real-time PCR (ANOVA, $p= 0,032$).

ASSOCIAÇÕES ECOLÓGICAS INTER-MICROBIANAS DETECTADAS NAS MÃES E NOS BEBÊS

A microbiota materna e das crianças, ao longo do tempo, permitiu que algumas correlações estatisticamente significativas entre os microrganismos estudados fossem detectadas.

Nesse sentido, *E. corrodens* parece ter associações sinérgicas com *C. rectus* (teste Qui-quadrado, $p = 0.022$), *A. actinomycetemcomitans* (teste Qui-quadrado, $p = 0.033$) e *T. forsythia* (teste Qui-quadrado, $p = 0.037$), enquanto *C. rectus* estabelece associações sinérgicas com *P. intermedia* (teste Qui-quadrado, $p = 0.045$) e *P. gingivalis* (teste Qui-quadrado com $p = 0.041$).

A associação entre *P. gingivalis* e *P. intermedia* (teste de Qui-quadrado, $p < 0.001$) mereceu destaque. Nas mães, as interações entre *T. forsythia* se deram de forma mais intensa com *F. nucleatum* (teste Qui-quadrado, $p = 0.032$), *P. intermedia* (teste Qui-quadrado com $p = 0.032$) e *P. gingivalis* (teste Qui-quadrado, $p = 0.016$). Além dessas associações, observou-se entre *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* (teste Qui-quadrado com $p = 0.015$), com *P. intermedia* (teste Qui-quadrado com $p = 0.023$).

Esses dados, quando considerados em função do tempo de análise e estabilidade de colonização, evidenciam a existência de três grupos diferentes de microrganismos. Um grupo composto por bactérias que raramente são isoladas da mesma criança em dois momentos diferentes, como *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *A.*

actinomycetemcomitans; outro grupo de microrganismos que, embora freqüentes na cavidade bucal da criança, raramente são isolados da mesma criança em dois momentos diferentes, o que sugere que a colonização bucal ainda depende de uma fonte constante de reinfecção ou distribuição em pontos anatômicos da cavidade bucal não submetidos à avaliação no presente estudo, como *C. rectus* e *P. intermedia*; e um terceiro grupo de microrganismos com colonização mais estável após a erupção dentária, como *S. mutans* e *S. sobrinus*, além de *F. nucleatum*. Apenas *T. denticola* não foi detectado na saliva ou biofilme das crianças, em nenhum momento do estudo.

Discussão

6 Discussão

6.1 *A*specto microbiológico

O estudo da microbiota bucal é indispensável para a compreensão da etiologia da grande maioria das enfermidades bucais, que acometem crianças e adultos, sendo que a maioria dessas doenças infecciosas é de natureza mista, em que há interação de várias espécies microbianas.

A composição da microbiota bucal das mães e dos bebês mostrou boa correlação entre biofilme dental e a contaminação salivar. Esse fato deve ser ressaltado, uma vez que, a saliva é o maior veículo de disseminação de microrganismos para diferentes sítios anatômicos na cavidade bucal, bem como para a transmissão entre diferentes indivíduos, particularmente mãe e filhos (UMEDA et al., 2004; DOGAN et al., 2008), e as numerosas espécies bacterianas presentes estabelecem inter-relações (MIYAMOTO et al., 2009), como também observado entre os microrganismos alvo do presente estudo, refletindo as alterações ecológicas observadas no biofilme dental.

A participação de diferentes microrganismos na etiologia das doenças periodontais (RYLEV; KILIAN, 2008) e da cárie dentária (BRAILSFORD et al., 1999) recebeu muita atenção nas últimas décadas e, embora a distribuição da maioria das espécies relacionadas a essas condições se mostre relativamente constante nas diferentes sociedades ao redor do mundo, particularidades associadas a localidades geográficas e hábitos, vêm sendo descritas (HAFFAJEE et al., 2004; HERRERA et al., 2008). No continente americano, em função da grande diversidade de influências associadas à colonização, hábitos e condições geográficas, essas particularidades se mostram marcantes, mesmo dentro de um único país (LAFURIE et al., 2007).

Esses aspectos se tornam cruciais quando se verifica que a microbiota bucal se estabelece precocemente e parece refletir, pelo menos para alguns de seus integrantes, as características da dieta alimentar, hábitos de higiene e a postura de pais e cuidadores sobre a prevenção das doenças de boca (PINTO, 2003). Além desse aspecto, o estabelecimento de cada microrganismo, no ambiente bucal, e o

futuro relacionamento com o hospedeiro parecem obedecer a um conceito de “janela de infectividade”, ou seja, a existência de um período no qual o hospedeiro, geralmente um bebê, exposto a um veículo de transmissão contaminado com uma dada espécie microbiana, seria mais facilmente colonizado por esse microrganismo. Esse conceito se difundiu a partir da “janela de infectividade para *S. mutans* e cárie dentária”, como descrito por Caufield et al. (1993) e pode, em teoria, ser aplicado para a grande maioria das espécies bacterianas e fúngicas que constitui a microbiota residente da cavidade bucal.

Entretanto, não se deve negligenciar a influência que medidas socioeducativas e preventivas, instituídas precocemente, como nas clínicas do Bebê, podem ter sobre a transmissão e a implantação de diferentes espécies da microbiota bucal. Além desse aspecto, não se pode confundir a colonização da cavidade bucal e risco de desenvolvimento de alguma enfermidade com a inevitabilidade dessa condição. Nesse sentido, quanto mais precoces foram as medidas preventivas, menores serão os danos e o próprio custo financeiro e social do tratamento e da prevenção implementados.

Inicialmente, o presente estudo procurava caracterizar a microbiota bucal de crianças com idade de 6 meses, durante um período de acompanhamento de 18 meses. Contudo, logo verificou-se que não seria possível traçar paralelos entre os resultados microbiológicos nesse estudo longitudinal visto que não estavam disponíveis os dados oriundos das mães das crianças, as quais provavelmente constituem a principal fonte de disseminação de microrganismos para as crianças estudadas. Assim optou-se por incluir as mães das crianças no estudo.

Além desse aspecto, a literatura nacional e internacional sobre a distribuição dos principais microrganismos associados com as doenças periodontais e cárie dentária traz uma grande gama de métodos de detecção dos microrganismos, desde cultura, hibridização DNA-DNA, PCR, real-time PCR e imunofluorescência, além da descrição das condições sociais e métodos de prevenção utilizados pelos participantes dos estudos, avaliação das condições periodontais das populações estudadas e a ocorrência de cárie, e, por fim, identidade dos microrganismos descritos na literatura. Face às profundas mudanças taxonômicas experimentadas por alguns gêneros microbianos, particularmente para as bactérias Gram-negativas anaeróbias, procurou-se optar pela utilização de artigos publicados a partir de 1999,

quando a identidade da maioria dos microrganismos estudados no presente estudo já estava estabelecida.

Não se pode negligenciar também o fato de que há pouco mais de 10 anos acreditava-se que microrganismos anaeróbios não poderiam ser transmitidos, e muito menos se manteriam na cavidade bucal de crianças edêntulas, uma vez que a ausência de dentes não permitiria a criação de um ambiente com potencial redox adequado para esses microrganismos. Entretanto, a formação de agregados microbianos e biofilme na superfície da mucosa, bem como a maior tolerância que esses microrganismos parecem ter ao oxigênio “in vivo”, quando comparados com a sua sensibilidade “in vitro”, mostraram que a cavidade bucal é habitat de numerosas espécies microbianas anaeróbias com variados graus de virulência e importância médica desde a mais tenra idade (KÖNÖNEN et al., 1999), justificando a realização desse estudo longitudinal.

Dentre os principais microrganismos detectados nas amostras clínicas destaca-se o gênero *Actinomyces*. A elevada ocorrência de actinomicetos nas amostras das mães está de acordo com o papel desempenhado por membros desse gênero como parte da microbiota bucal, mais associada com saúde gengival ou gengivite leve (CARVALHO et al. 2009; DEMMER et al., 2008; TANNER et al., 2007), cárie radicular ou em dentina em adultos (BRAILSFORD et al., 1999; YIP et al., 2007) e fazem parte do conjunto de microrganismos conhecidos como colonizadores iniciais do biofilme, por sua capacidade de produzir polímeros extracelulares e de aderir à superfície dentária logo no início do seu processo de formação (BRAILSFORD et al., 1999). Esses bastonetes na superfície do cimento possuem capacidade de desmineralização maior do que *Lactobacillus* spp. ou *S. mutans* podendo levar ao desenvolvimento de microlesões de cárie (YIP et al., 2007).

Entretanto, pouco se sabe sobre a colonização da cavidade bucal de crianças por esse gênero microbiano, acrescentando-se o problema adicional das dificuldades de ordem taxonômica envolvendo esses bastonetes Gram-positivos e sua identificação envolvendo métodos de cultivo (BRAILSFORD et al., 1999).

No presente estudo, a elevada frequência de detecção desses bastonetes Gram-positivos nas mães também pode ser associada à relativa insensibilidade de *Actinomyces* spp. aos íons fluoreto utilizados na prevenção da cárie e pela sua atividade proteolítica, a qual faz com que nutrientes de natureza protéica, que

normalmente não seriam aproveitados por microrganismos cariogênicos na dentina, sejam utilizados, bem como os carboidratos da dieta alimentar (BRAILSFORD et al., 1999), o que minimizaria as eficácias das estratégias preventivas. Além desse aspecto, esse microrganismos são tolerantes ao oxigênio (BRAILSFORD et al., 1999), de forma que a efetividade do peróxido de hidrogênio utilizado pelas mães na higiene bucal das crianças fica restrita à capacidade desse agente químico em remover matéria orgânica dos tecidos, sem atividade antimicrobiana significativa sobre esses bastonetes.

Os actinomicetos possuem a capacidade de estabelecer associações ecológicas com diferentes microrganismos, como as fusobactérias e *P. intermedia* (SHEN et al., 2005). Quando os dados das tabelas de contaminação salivar e do biofilme são analisados, verifica-se que o aumento da frequência de detecção de *F. nucleatum* e do gênero *Actinomyces* segue padrões semelhantes e paralelos, embora a prevalência de *F. nucleatum* seja significativamente mais elevada, principalmente no início do período de avaliação, o que pode refletir a grande capacidade de adesão das fusobactérias às células da mucosa bucal.

Os dados do presente estudo podem, com as devidas limitações, ser considerados como complementares aos obtidos por Papaioannou et al. (2009), que mostraram que a maturação e o estabelecimento do biofilme bucal, particularmente os actinomicetos e os membros do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*), é paulatina e gradual. Entretanto, para *Actinomyces* spp., a colonização da cavidade bucal foi potencializada pela erupção dentária, o que mostra que a modificação do ambiente bucal por eventos marcantes como esse podem ter grandes reflexos na microbiota. A erupção dentária cria condições para o desenvolvimento da película adquirida e formação do biofilme, o qual tem nos actinomicetos a principal fonte de levanos e outros polímeros extracelulares de carboidratos (BUSSCHER; EVANS, 1998), os quais podem se converter em fontes de carboidratos fermentáveis hidrossolúveis para outros membros do biofilme.

Quanto à ocorrência de *Actinomyces* spp. na cavidade bucal de crianças edêntulas, os resultados aqui apresentados evidenciam que a contaminação inicial da cavidade bucal das crianças deve ser bastante precoce, seguida pela colonização paulatina de um número crescente de bebês, como também observado por Sarkonen et al. (2007), que detectaram esses bastonetes na grande maioria das

amostras de biofilme dental e cada uma das principais espécies presentes pode ser observada em 40 a 50% das crianças a partir dos 6 meses de idade.

Contudo, no presente estudo, a ocorrência desses microrganismos foi significativamente menor do que a descrita por Könönen et al. (1999) e Sarkonen (2007) em que, aos dois meses de idade, 30% das crianças eram portadoras desses microrganismos na saliva, enquanto, aos 24 meses, mais de 90% das crianças albergavam esses bastonetes Gram-positivos. Os dados aqui apresentados evidenciaram *Actinomyces* spp. em 16% das amostras de saliva das crianças com 6 meses de idade, mostrando um grande aumento de prevalência aos 12 meses, correspondendo ao período de erupção dos primeiros dentes decíduos, e cuja ocorrência novamente se exacerbou entre os 18 e 24 meses de idade, atingindo 48,65% das amostras de saliva e 56,76% das amostras de biofilme, valores semelhantes aos descritos por Tanner et al. (2002) para crianças com 19-36 meses de idade. Esses dados são significativamente diferentes dos relatados por Cole et al. (1998), que falharam em detectar esses microrganismos antes da erupção dos primeiros dentes.

A discrepância entre os resultados desses estudos pode estar no conceito errôneo de que a existência de elementos dentais seria pré-requisito para a colonização da cavidade bucal por actinomicetos (KÖNÖNEN et al., 1999; SARKONEN, 2007), sendo que, no presente estudo, não foi avaliada a contaminação das mucosas, mesmo que parte da microbiota das mucosas das crianças tenha sido coletada acidentalmente com o uso das zaragatoas para coleta de saliva. A avaliação das mucosas poderia elevar a frequência de detecção desses microrganismos, aproximando-se dos dados de Sarkonen et al., 2007. Os dados do presente estudo sugerem que se os dentes não são fundamentais para a implantação inicial desses microrganismos, eles certamente são importantes, uma vez que a frequência de colonização da cavidade bucal das crianças aos 12 e aos 24 meses mostrou influência do fenômeno de erupção dentária.

Além desse aspecto, esse gênero microbiano apresenta grande diversidade de espécies e é bastante provável que cada uma apresente um cronograma próprio de estabelecimento na cavidade bucal, com as espécies com maior afinidade pela superfície dentária colonizando de forma mais tardia, como *A. viscosus*, enquanto outras, como *A. odontolyticus*, colonizariam mais precocemente a mucosa (SARKONEN, 2007). Essas diferenças ocorrem devido a diferentes modelos de

interação entre receptores do hospedeiro e adesinas microbianas tanto na superfície de células da mucosa e proteínas na película adquirida, em que polipeptídeos ricos em prolina seriam relevantes para o processo de adesão (HALLBERG et al., 1998), bem como o fenômeno de sucessão ecológica na formação da microbiota bucal e o biofilme em particular (KÖNÖNEN et al., 1999).

Aspecto notável observado, no presente estudo, é a estabilidade da colonização da cavidade bucal pelos actinomicetos logo no início do presente estudo. Nesse sentido, uma criança colonizada por esses bastonetes apresentava mais de 70% de chances de manter o microrganismo ao longo do tempo de avaliação, e se mostrar portadora nas próximas coletas dos espécimes clínicos. Este achado foi também relatado por Tanner et al. (2002) para crianças na mesma faixa etária.

Dentre os principais microrganismos associados aos quadros infecciosos periodontais, merece destaque *A. actinomycetemcomitans*, freqüentemente ligado aos quadros mais agressivos dessas doenças (CARVALHO et al., 2009; CORTELLI et al., 2005; DOGAN et al., 2008; GAETTI-JARDIM JÚNIOR et al., 2006; GAETTI-JARDIM JÚNIOR et al., 2008; LAFAURIE et al., 2007), mas também implicado em infecções crônicas (EBERSOLE et al., 2008). O “Consensus Report on Periodontal Diseases”, em 1996, declarou que existiam evidências para considerar que *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (renomeado *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis*, e *Bacteroides forsythus* (renomeado *Tannerella forsythia*) são os principais patógenos das doenças periodontais humanas.

A. actinomycetemcomitans merece destaque por ser um dos microrganismos bucais cuja distribuição apresenta notável influência das características étnicas e geográficas das populações humanas envolvidas (RYLEV; KILIAN, 2008), tendo sido detectado em 35%-45% dos pacientes norte americanos com periodontite crônica (ANGELOV et al., 2009; EBERSOLE et al., 2008), de 52% a 90% dos brasileiros com essa condição periodontal (COLOMBO et al., 2005), 65,5% das pacientes grávidas norte-americanas com esse tipo de periodontite (PERSSON et al., 2008), de 76 a 93,5% dos pacientes tailandeses descritos por Hintao et al. (2007) e 86,4% dos mexicanos com periodontite (XIMENEZ-FYVIE et al., 2006), além de elevada prevalência na África (HAUBEK et al., 2008) e China (TONG et al., 2003; WU et al., 2007).

Esses dados são muito mais elevados do que os observados para o biofilme das mães, no presente estudo, em que essa espécie foi cultivada ou detectada por PCR de 23,33% a 28% das amostras de biofilme. Esses dados são, inclusive, inferiores aos dados de Gaetti-Jardim Júnior et al. (2006), que estudaram a prevalência e distribuição desse cocobacilo em brasileiros com diferentes condições de saúde periodontal, incluindo homens e mulheres saudáveis ou com gengivite leve. Contudo, o grupo amostral desses autores apresentava, mesmo entre os saudáveis, maior índice de placa e não se deve esquecer que, ao orientar as mães para a higiene do bebê, acaba-se reforçando a necessidade de um maior controle do biofilme das próprias mães, o que pode ter colaborado para essa diferença.

Para as mães, os dados aqui apresentados são intermediários aos observados por Gaetti-Jardim Júnior et al. (2006) e os reportados por Lafaurie et al. (2007). Esses últimos autores estudando diversas populações colombianas, verificaram a presença desse microaerófilo em, aproximadamente, 5% dos indivíduos periodontalmente saudáveis. Nesse sentido, uma baixa prevalência desse microaerófilo na Colômbia (BOTERO et al., 2007; HERRERA et al., 2008), Holanda (BOUTAGA et al., 2006) e Espanha (HERRERA et al., 2008) vem sendo relatada, com uma ocorrência de menos de 10% na população adulta saudável.

A maioria dos estudos sobre a distribuição de *A. actinomycetemcomitans* em crianças e adolescentes mostra que a ocorrência do mesmo pode ser bastante modesta, independentemente da metodologia utilizada, como também pode ser observado no presente estudo. Könönen et al. (1999) falharam em detectá-lo em crianças com idade inferior a 12 meses, o mesmo ocorrendo em outros estudos com crianças pequenas e saudáveis (FRISKEN et al., 1990; KÖNÖNEN et al. 1992, 1994). Entretanto os métodos empregados então eram significativamente menos sensíveis do que o PCR hoje utilizado, o que pode corroborar para as diferenças observadas entre esses estudos os resultados aqui mostrados. Enquanto Alaluusua e Asikainen (1988) detectaram-no, através de cultura, em 13% das crianças com dentição decídua.

A ocorrência de *A. actinomycetemcomitans* no biofilme das crianças estudadas foi bastante modesta, sempre abaixo de 9%, sendo que nenhuma criança mostrou a presença desse microrganismo em duas coletas subsequentes, sugerindo que a presença deste microaerófilo seria apenas transitória nessas crianças com 24 meses ou menos de idade. Esses dados estão de acordo com Umeda et al. (2004),

tanto os dados referentes à contaminação salivar quanto a que se refere ao biofilme, embora esses autores tenham avaliado a ocorrência desse microrganismo em crianças japonesas com idade entre 1-15 anos, incluindo 26 com dentição decídua. Nossos resultados também se afinam com os de Cortelli et al. (2008), que demonstraram que esse microrganismo, mesmo sendo muito freqüente em brasileiros com periodontite, é bastante raro na dentição decídua praticamente inexistente antes da erupção dessa última. Os dados referentes à contaminação salivar evidenciam valores muito inferiores aos observados para crianças mais velhas e bastante semelhantes aos evidenciados por Okada et al., (2002), Yang et al. (2002) e Sakai et al. (2007), este último com crianças brasileiras. Nesse particular, Okada et al. (2002) mostraram que a idade média para a aquisição desse microrganismo é de 3,5 anos.

A transmissão desse microaerófilo é dependente de contato freqüente entre a fonte de infecção e a criança, sendo que a mãe na grande maioria dos casos se comporta como fonte de disseminação (DOGAN et al., 2008). Nesse particular, após a aquisição desse microrganismo também aumentam os riscos de perda de inserção conjuntiva. Tamura et al. (2006) observaram correlação estatística entre a presença desses microrganismos na saliva das mães e sua presença na cavidade bucal de crianças com idade de 2 a 12 anos. Contudo, a quantidade de amostras positivas para *A. actinomycetemcomitans*, no presente estudo, foi insuficiente demais para a confirmação estatística dessa hipótese.

Outro aspecto controverso diz respeito aos efeitos que a colonização pelo *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* tem sobre as condições de saúde gengival em crianças. Nesse sentido, Morinushi et al. (2000) advogam que a presença desses dois microrganismos está associada à maior severidade da gengivite nas crianças, mas a idade mais provável para que esse processo se desencadeie seria o período pré-pubertal. No presente estudo, todas as crianças colonizadas por esses microrganismos mostravam boas condições de saúde gengival, entretanto não se pode desconsiderar o fato de que nas mesmas observou-se uma inconstância na detecção desses patógenos, o que sugere transitoriedade da presença dos mesmos, não configurando uma colonização estável, como discutido por Morinushi et al. (2000).

Outros estudos mostram uma aquisição progressiva desse microaerófilo, como Tanner et al. (2002), com crianças de duas faixas etárias (6-18 meses e 19-36

meses) das ilhas Marianas, no oceano Pacífico, em que entre 22 e 24% das crianças com idade de 6 a 18 meses possuíam esse microrganismo no biofilme e entre 23-39% das crianças albergavam um dos seus sorotipos na idade de 19-36 meses. Contudo, nesse último estudo, as crianças não estavam inseridas em um programa educativo-preventivo, o que poderia explicar parcialmente essas diferenças, além do fato de que determinadas espécies de estreptococos associadas com saúde bucal, como *S. mitis*, *S. salivarius* e *S. sanguinis* podem antagonizar esse microrganismo e impedir a sua implantação na cavidade bucal por mecanismos ainda não caracterizados (TEUGHELIS et al., 2007). Como esses cocos Gram-positivos são bastante freqüentes na dentição decídua (TANNER et al., 2002), essas interferências podem ter, de fato, ocorrido no presente estudo.

O principal fator de virulência desse microrganismo parece residir na produção de uma potente leucotoxina (FIVES-TAYLOR et al., 1996) e maior atenção deveria ser dada às cepas altamente leucotóxicas, que sofreram uma deleção de 530 pb no promotor do gene que codifica para essa proteína (HAUBEK et al., 2008), existindo forte correlação entre a colonização do sulco gengival por cepas altamente leucotóxicas desse microaerófilo e o desenvolvimento de periodontite agressiva localizada (CORTELLI et al., 2005). Entretanto, embora a associação de cepas altamente leucotóxicas de *A. actinomycetemcomitans* com periodontite agressiva localizada seja bem documentada (FIVES-TAYLOR et al., 1996; HAUBEK et al., 2008), existem relatos que evidenciam a ocorrência dessas doenças periodontais em pacientes que não são colonizados por linhagens altamente leucotoxigênicas, como evidenciado por Leung et al. (2005), na China.

Dentre os microrganismos aqui avaliados, *C. rectus* e *E. corrodens* merecem destaque não somente pela freqüência de detecção, mas pelas significativas associações observadas com outras espécies bacterianas no biofilme microbiano e possível participação dessas espécies nas modalidades mais agressivas de periodontite.

Quanto a participação de *C. rectus* nas doenças periodontais, a literatura não apresenta consenso. Enquanto vários estudos (CARVALHO et al., 2009; KUMAR et al., 2003; MAYANAGI et al., 2004; SUDA et al., 2004; XIMENEZ-FYVIE et al., 2006) evidenciam que esse microrganismo é comensal na cavidade bucal, tanto em sadios como em pacientes com periodontite, outros estudos, particularmente envolvendo pacientes norte-americanos, mostram baixa freqüência desse microrganismo

(EBERSOLE et al., 2008; HAFFAJEE et al., 2006). Nesse sentido, também é bastante significativa a literatura que o associa com a periodontite crônica (COLOMBO et al., 2002, 2005; DAHLÉN; LEONHARDT, 2006; DOGAN et al., 2003; LAFAURIE et al., 2007; PAPAPANOU et al., 2002; RAMSEIER et al., 2009; YOKOYAMA et al., 2008) e agressiva (DOGAN et al., 2003; LAFAURIE et al., 2007). Lafaurie et al. (2007) reportaram que em colombianos com periodontite havia nítida associação geográfica e ecológica entre *C. rectus* e *E. corrodens*, como também observado no presente estudo, no biofilme de mães e crianças.

Por PCR convencional, os dados apresentados no presente estudo evidenciaram a presença de *C. rectus* na saliva de 26,0% das crianças com 6 meses e em 34% de suas mães, sugerindo uma colonização precoce e que se manteve mais ou menos constante ao longo do tempo, atingindo 29,73% das amostras de saliva aos 24 meses nas crianças e 43,33% nas mães. No biofilme, o mesmo fenômeno esteve presente. Nesse sentido, juntamente com *Fusobacterium nucleatum* e os actinomicetos, *C. rectus* foi o microrganismo com colonização mais estável na cavidade bucal de crianças e suas mães.

Dentre os microrganismos estudados, *C. rectus* foi um dos que apresentaram melhor correlação entre ocorrência no biofilme dental e presença do microrganismo na saliva, fato também relatado por Ramseier et al. (2009). Esses dados referentes às mães foram ligeiramente superiores aos descritos por Lafaurie et al. (2007) e Colombo et al. (2005), para colombianos e brasileiros com gengivite ou saudáveis.

Poucos estudos relatam a ocorrência desse bastonete na microbiota de crianças edêntulas e na dentição decídua. Os dados apresentados mostram uma ligeira elevação na prevalência desse microrganismo no biofilme de crianças, saindo de 21,43% aos 12 meses até 35,14% aos 24 meses de idade, valores inferiores aos apresentados por Tanner et al. (2002), em que 43% das amostras de biofilme de crianças aos 6-18 meses eram positivas e esse valor se elevava para 50% na faixa etária de 19-36 meses, enquanto Cortelli et al. (2008) advogam que esse microrganismo seria ubíquo na cavidade bucal, observando também a elevação da prevalência desse microrganismo nas crianças com mais de dois anos de idade, em que esse bastonete colonizaria de 60 % a 80% dos indivíduos.

Possivelmente essa espécie possui linhagens com padrões de virulência muito diferentes bem como distribuição irregular na população, de forma que autores como Umeda et al. (2004), que detectaram esse microrganismo na quase totalidade

das amostras de biofilme bucal de crianças e adolescentes com idade de 1 a 15 anos, no Japão, ou Tamura et al. (2006), que observaram a presença dessa bactéria em menos de 10% das crianças com idade de 2 a 12 anos, no mesmo país, podem estar descrevendo realidades restritas a determinados grupos humanos e hoje já são bem conhecidas as influências étnicas, culturais, sociais e geográficas sobre a microbiota bucal (HAFFAJEE et al., 2004).

A participação de *E. corrodens* no desenvolvimento de gengivite vem sendo questionada. Alguns estudos suportam um papel mais significativo desse microrganismo nas doenças periodontais crônicas (KUMAR et al., 2003; COLOMBO et al., 2005; PERSSON et al., 2008) ou agressivas (BOTERO et al., 2007), mas estudos sobre a virulência e diversidade genética dessa espécie devem ser realizados, visto que outras pesquisas evidenciam uma freqüência semelhante de colonização em sadios, indivíduos com gengivite e pacientes com periodontite (HAFFAJEE et al., 2006; MAYANAGI et al., 2004; RAMSEIER et al., 2009; SUDA et al., 2004).

As discrepâncias deste estudo, parecem refletir possíveis condições periodontais das mães e familiares e o fato de que as crianças do presente estudo eram mantidas em um programa educativo-preventivo em que se estimula a restrição ao consumo de sacarose, em função da prevenção à carie dentária, e sabe-se que a restrição a esse carboidrato acaba por reduzir o volume do biofilme formado (BAUMGARTNER, et al., 2009), o que pode afetar a distribuição desse patógenos, visto que o mesmo é muito mais freqüente em indivíduos com controle precário do biofilme (FRISKEN et al., 1990).

Embora a presença desse microrganismo tenha sido mais freqüente nas crianças e suas mães, no presente estudo, em relação aos dados desses últimos autores, também se verificou boa associação entre a presença dessa bactéria na cavidade bucal das mães e sua presença na criança, independentemente do momento de coleta do biofilme ou saliva, como descrito por estes autores.

Dentre os principais microrganismos bucais, merece destaque os anaeróbios Gram-negativos do gênero *Fusobacterium*, em particular *F. nucleatum*. Esse microrganismo possui grande capacidade de coagregação (KOLENBRANDER; LONDON, 1993), o que constitui o principal mecanismo de colonização da cavidade bucal pela maioria das espécies do biofilme microbiano. Sua ampla capacidade de adesão às células do hospedeiro e de estabelecer pares de coagregação com outros

microrganismos bucais é notória e provavelmente ajuda a explicar as associações estatísticas observadas entre esse microrganismo e os demais.

As fusobactérias, embora por vezes associadas às doenças periodontais, também são freqüentes em indivíduos sadios e existem controvérsias quanto à sua importância no estabelecimento e progressão das periodontopatias, de forma que enquanto algumas subespécies podem se comportar como comensais (BOUTAGA et al., 2006; CARVALHO et al., 2009; EBERSOLE et al., 2008; MAYANAGI et al., 2004; TANNER et al., 2007; XIMENEZ-FYVIE et al., 2006), outras, como *F. nucleatum* subsp. *vinventii* poderiam ter papel ativo nos danos aos tecidos periodontais (COLOMBO et al. 2005; PAPAPANOU et al., 2002), embora não haja consenso sobre esse aspecto (CARVALHO et al., 2009).

Nas mães, *F. nucleatum* foi freqüente, o que está de acordo com a literatura que o associa ao desenvolvimento de gengivite ou periodontite crônica (COLOMBO et al. 2005; PAPAPANOU et al., 2002), sendo que a virulência desse anaeróbio fusiforme seria potencializada por pequenos níveis de *P. gingivalis*, *T. forsythia* ou *E. corrodens* (HAFFAJEE et al., 2006), decorrendo dessa constatação a necessidade de manter condições mínimas de controle do biofilme, uma vez que esses microrganismos foram detectados nas mães com freqüência moderada e as crianças são expostas ao risco de adquiri-las.

Entretanto, dada a grande diversidade genética dessa espécie, é problemático atribuir um único papel para todas as subespécies. Assim, desde que, na maioria dos estudos, esse microrganismo foi detectado em freqüência elevada tanto em sadios quanto em pacientes com gengivite ou periodontite, muitos o consideram um comensal que pode apresentar capacidade de agredir o hospedeiro em condições favoráveis (BOUTAGA et al., 2006; EBERSOLE et al., 2008; MAYANAGI et al., 2004; TANNER et al., 2007; XIMENEZ-FYVIE et al., 2006;). É possível que com o desenvolvimento de alterações inflamatórias periodontais, esse anaeróbio, cujo metabolismo se mostra dependente da fermentação de aminoácidos, possa ser beneficiado do ponto de vista nutricional, com o aumento do fluído do sulco gengival e maior aporte de peptídeos, levando a um gradativo aumento de sua prevalência e nas suas populações periodontais.

Os dados do presente estudo, tanto por cultura, quanto por PCR, confirmam o ponto de vista de que *F. nucleatum* é precocemente transmitido para as crianças edêntulas, constituindo um dos primeiros anaeróbios a fazer parte da microbiota

bucal humana. Esse ponto de vista vem sendo estabelecido desde o estudo clássico de Frisken et al. (1990), que verificaram que 25% das crianças logo adquiriam esse microrganismo e que a frequência de colonização rapidamente aumentava até os 3 anos de idade. Pelos resultados aqui apresentados, entre os 12 e 18 meses de vida foi o período que ocorreu a maior elevação da colonização bucal por esse microrganismo, mantendo-se mais constante até o final do estudo.

A grande importância desse microrganismo para a formação do biofilme supera, e muito, a sua capacidade de agressão ao hospedeiro, de forma que cuidados especiais devem ser dados à criança e seus familiares, visto que sua ocorrência nas mães foi bastante elevada e, sua transmissão, precoce, como mostrado também por Könönen et al. (1999) e Tanner et al. (2002). Assim, talvez seja adequado melhorar as condições de higiene bucal das mães, uma vez que o risco de transmissão dessa bactéria se mostrou tão elevado quanto o observado para os cocos cariogênicos, que sempre foram objeto da grande maioria das políticas de prevenção na Bebê-Clínica. Esse fato ganha relevância se considerarmos a precocidade da manifestação da lesão de cárie dentária em relação às alterações periodontais.

Além de transmitido precocemente, os resultados sugerem que esse anaeróbio estabelece colonização estável nas crianças, uma vez que as mesmas crianças que o albergavam aos 6 meses continuaram a fazê-lo aos 12, 18 e 24 meses, além de outras crianças que foram colonizadas ao longo desse tempo. Essa estabilidade de colonização também foi descrita por Haraldsson et al. (2004) e é da maior relevância, uma vez que *F. nucleatum* é considerado uma ponte entre os colonizadores iniciais do biofilme, representados pelos estreptococos e actinomicetos, e os colonizadores finais, como os gêneros *Treponema*, *Porphyromonas* e *Prevotella*, entre outros (KOLENBRANDER; LONDON, 1993).

A despeito da importância desses microrganismos, um conjunto de anaeróbios coletivamente denominados de “complexo vermelho de Socransky” (SOCRANSKY et al., 1998) passou a dominar as pesquisas sobre a etiologia e a prevenção das doenças periodontais. Esse complexo é constituído por *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia*, os quais são anaeróbios altamente proteolíticos capazes de induzir destruição dos tecidos de suporte dental, sendo considerados indicadores de risco de perdas de inserção conjuntiva (FENG; WEINBERG, 2006; SOCRANSKY et al., 1998;).

P. gingivalis e *T. forsythia* vêm sendo implicados com perda óssea em diversas populações ao redor do mundo, como Estados Unidos (EBERSOLE et al., 2008; HAFFAJEE et al., 2006; PERSSON et al., 2008), Colômbia (LAFABRIE et al., 2007), Japão (EGUCHI et al., 2008; MAYANAGI et al., 2004), Suécia (DAHLÉN; LEONHARDT, 2006), Holanda (BOUTAGA et al., 2006) e Brasil (CARVALHO et al., 2009; COLOMBO et al., 2005; GAETTI-JARDIM JÚNIOR et al., 1998). Alguns estudos sobre *T. forsythia* em determinadas populações, como a mexicana (XIMENEZ-FYVIE et al., 2006), sueca (DAHLÉN; LEONHARDT, 2006) e japonesa (EGUCHI et al., 2008), mostram que o mesmo pode ser freqüente entre alguns indivíduos saudáveis.

Os dados aqui apresentados sustentam que tanto *P. gingivalis* quanto *T. forsythia* são raros e transitórios na saliva e biofilme de crianças com até 24 meses de idade. No biofilme foram detectados sempre em freqüência modesta e sem alterações de prevalência muito significativas no período compreendido pelo estudo. Essas informações se alinham com os dados de Mättö et al. (1998), com crianças finlandesas, Umeda et al. (2004) e Tamura et al. (2006), com crianças japonesas e suas mães, Kulekci et al. (2008), com crianças de 6 a 13 anos na Turquia, Cortelli et al. (2005), com pacientes brasileiros de várias faixas etárias, incluindo crianças com dentição decídua. Contudo, não são conhecidos os fatores que não permitiriam um estabelecimento mais precoce desse microrganismo em crianças com dentição decídua.

Em algumas populações americanas, quando a presença de *P. gingivalis* era observada exclusivamente por intermédio de cultura, a sua ausência parecia refletir mais as limitações da técnica do que um fenômeno real. Com o advento de métodos moleculares, como o PCR e a hibridização DNA-DNA, nos anos 90, na maioria dos casos esse microrganismo continuou sendo detectado em freqüência muito baixa, como os estudos acima mencionados, mas outras pesquisas, como a de McClellan et al. (1996), com crianças nos Estados Unidos, e Gafan et al. (2004), no Reino Unido, verificaram a presença desse anaeróbio em 45% das crianças com dentição decídua e mista.

A despeito de algumas controvérsias, como as descritas acima, existe concordância na literatura de que quando a mãe, ou o indivíduo responsável pelos cuidados com a criança, é portador do microrganismo, o risco de transmissão aumenta significativamente (ASIKAINEN et al., 1996; WATSON et al., 1994), o que

justifica a instrução de cuidados especiais para a mãe que apresenta gengivite severa ou periodontite, uma vez que não se consegue evitar que uma fonte abundante de infecção venha a transmitir o microrganismo para a criança com a qual tem contato freqüente, a menos que os níveis de infecção da mãe sejam controlados.

Uma condição bastante semelhante diz respeito a *T. forsythia*, com a peculiaridade de que a literatura sobre esse anaeróbio é muito mais escassa. No presente estudo, aos 18 meses de idade, apenas uma criança fora positiva para esse bastonete, o mesmo ocorrendo com oito mães. Aos 24 meses, dois bebês foram positivos para essa bactéria, mas nenhum deles apresentara esse organismo antes, sugerindo que a presença do mesmo seja transitória, com o que os resultados de Kulekci et al. (2008) concordam.

Tanner et al. (2002) relataram a presença dessa bactéria em 14% das crianças com idade entre 6 e 18 meses, mantendo-se nesse patamar entre 19 e 36 meses, enquanto Kulekci et al. (2008), com crianças entre 6 e 13 anos, não detectou esse anaeróbio. Já Cortelli et al. (2008), conservaram-no em 5% das crianças com idade entre zero e quatro meses e em, aproximadamente, 10% das crianças com idade entre dois e cinco anos, corroborando para a conclusão de que essa bactéria não é parte da microbiota bucal de crianças com idade inferior a 24 meses. Poucos estudos vão contra esse posicionamento, como Gafan et al. (2004), em que 65% das crianças com 5 a 9 anos são portadores de *T. forsythia*. Não estão disponíveis dados relativos as crianças nas faixas etárias compreendidas pelo presente estudo.

Desde a década de 1960, cogita-se a possibilidade de participação de diferentes espiroquetas bucais no desenvolvimento das doenças periodontais. Estudos realizados principalmente na Europa Ocidental, Estados Unidos, Japão, sudeste asiático (DAHLÉN; LEONHARDT, 2006; EBERSOLE et al., 2008; EGUCHI et al., 2008; HINTAO et al., 2007; KUMAR et al., 2003; MAYANAGI et al., 2004; PAPAPANOU et al., 2002; RAMSEIER et al. 2009; TAKEUCHI et al., 2001) e Brasil (COLOMBO et al., 2002, 2005) evidenciaram que *Treponema denticola*, a espiroqueta bucal mais amplamente estudada, apresenta relação com a perda de inserção conjuntiva e é detectada em freqüência muito superior nos pacientes com periodontite ativa. Entretanto, em algumas populações latino-americanas, a distribuição desse microrganismo parece ser muito mais restrita, tendo sido isolado de 5% dos maias da Guatemala (DOWSETT et al., 2002) e de 17% dos índios do

Parque Indígena do Xingu (IDE et al., 2000), contudo a descrição clínica da condição periodontal desses indivíduos é falha.

Em nosso estudo, os dados de baixa prevalência desse microrganismo nas mães e seus filhos contrastam com os resultados de Kulekci et al. (2008), em que havia predominância de 32% nas crianças com 6 a 13 anos na Turquia, e Tanner et al. (2002), que encontraram aproximadamente 30% das crianças entre 6-18 meses de idade e 19-36 meses portadoras deste microrganismo. Entretanto novos estudos têm questionado o papel dessa espiroqueta no desenvolvimento das periodontites, particularmente as agressivas (CARVALHO et al., 2009).

A literatura sugere que *P. intermedia*, um anaeróbio Gram-negativo associado às gengivites e periodontites em humanos, raramente encontrado em crianças, seria transitório na cavidade bucal (CORTELLI et al., 2008; KÖNÖNEN et al., 1999; KULEKCI et al., 2008), mas os resultados aqui apresentados mostram com segurança maior do que estudos transversais poderiam oferecer, que aproximadamente 20% das crianças e entre 40 e 50% das mães são colonizadas por essa bactéria.

A compreensão do papel desempenhado por *Prevotella intermedia* e *P. nigrescens* nas doenças periodontais é dificultado pelo fato de que a maioria dos artigos publicados até o final da década passada não distinguem as duas espécies, as quais somente podem ser identificadas através de métodos moleculares. A prevalência de *P. intermedia* em populações latino-americanas com periodontite é bastante variável, indo de 22% (IDE et al., 2000) a mais de 70% dos pacientes (DOWSETT et al., 2002).

Por outro lado, Suda et al. (2004), com adolescentes japoneses, Ximenez-Fyvie et al. (2006), com mexicanos, e Dahlén e Leonhardt (2006), com pacientes suecos sadios ou portadores de periodontite, evidenciam que *P. intermedia* é freqüente mesmo na ausência de inflamação gengival. Parcela significativa da literatura sustenta que esses anaeróbios participariam da inflamação gengival e, em menor extensão, perda de inserção conjuntiva (BOTERO et al., 2007; COLOMBO et al., 2002, 2005; DOGAN et al., 2003; LAFAURIE et al., 2007; MAYANAGI et al., 2004; PAPAPANOU et al., 2002; RAMSEIER et al., 2009), sendo mais comuns em lesões periodontais profundas e associado a *P. gingivalis* (ANGELOV et al., 2009). Entretanto, como observado por Herrera et al. (2008), o papel desempenhado por esses anaeróbios varia significativamente de uma população para outra, tendo sido

considerado relevante em colombianos e espanhóis com periodontite crônica e rara em chilenos com essa mesma condição clínica.

No que se refere à ocorrência em crianças, nossos dados se assemelham aos de Tanner et al. (2002), que mostraram a presença desse microrganismo em 26% dos bebês com até 18 meses de idade e 43% das crianças com idade entre 19 e 36 meses. Outros estudos como Könönen et al. (1999) e Cortelli et al. (2008), que observaram a presença desse microrganismo em 5% das crianças de 12 meses, Kulekci et al. (2008), em que esse microrganismo não foi detectado. A comparação desses dados sugerem que peculiaridades das populações de crianças ou, mais precisamente, dos pares bebês-mães, podem interferir com a estabilidade de colonização.

Ao longo do experimento, verificou-se a ocorrência de alguns periodontopatógenos em associações, de forma que algumas crianças concentravam a maioria das amostras positivas. Entretanto essa microbiota mais complexa era transitória e não era detectada novamente na próxima visita para avaliação na Bebê-Clínica. Fenômeno semelhante foi descrito por Nakano et al. (2008), em que parecia haver uma inter-relação entre a ocorrência dos principais microrganismos bucais, particularmente os do “complexo vermelho de Socransky”.

Desde a década de 80 sabe-se que o estabelecimento precoce de estreptococos cariogênicos nos incisivos decíduos está intimamente ligado ao desenvolvimento de cárie na dentição decídua e que a severidade da doença apresenta relação direta com os níveis de infecção por esse grupo de microrganismos (ALALUUSUA; RENKONEN, 1983; KÖHLER et al., 1988). Deve-se ressaltar, nesses microrganismos, a sua acidogenicidade e aciduridade, além de capacidade de produção de polímeros de reserva energética e polímeros extracelulares insolúveis de carboidratos (MATTOS-GRANER et al., 2000).

De uma forma geral a literatura reforça a importância da transmissão vertical, dos pais (mãe, em particular) para a criança (ALVES et al., 2009; BERKOWITZ, 2006; CAUFIELD et al., 1993), e a transmissão horizontal, que poderia se dar entre as próprias crianças e entre essas e seus cuidadores (ALVES et al., 2009; BERKOWITZ, 2006; CAUFIELD et al., 1993; EMMANUELSON et al., 1998; MATTOS-GRANER et al., 2001). Os resultados do presente estudo não podem reforçar ou reduzir a força dessas hipóteses, até por que não eram objetivos do mesmo, mas verificou-se boa correlação entre presença desses cocos cariogênicos

na cavidade bucal das crianças e de suas mães. Entretanto, para comprovar essa suposição, seriam necessárias avaliações da diversidade clonal dos cocos cariogênicos das crianças, de seus familiares e cuidadores, o que extrapola os objetivos iniciais do projeto.

Inicialmente acreditava-se que as crianças não albergavam essas bactérias cariogênicas até algum tempo após a erupção dentária, sendo que esses estreptococos necessitariam de superfícies duras não descamativas para sua adesão e colonização (BERKOWITZ et al., 1975; CATALANOTTO et al., 1975; CAUFIELD et al., 1993). Os dados desse projeto reforçam a crença de que após um período inicial de transitoriedade, com o aumento do número de elementos dentais na cavidade bucal, a colonização se estabilizaria e, em torno de 20% das crianças, em particular os que desenvolveram lesões de mancha branca e cavitação, esses cocos cariogênicos passariam a fazer parte da microbiota bucal mesmo antes da erupção dos molares decíduos.

Segundo o clássico estudo de Caufield et al. (1993), introduzindo a realidade da janela de infectividade para *S. mutans* e demais cocos do grupo, o aumento rápido da prevalência de estreptococos cariogênicos estaria ligado a um conjunto de eventos biológicos, como a erupção dentária, particularmente dos molares decíduos com suas fóssulas e fissuras capazes de permitir o desenvolvimento de um biofilme rico nesses cocos. Nesse conceito, os dentes representariam, na opinião de seus proponentes, áreas virgens abertas à colonização por *S. mutans* e seus congêneres, como *S. sobrinus*. Entretanto, os dados do presente estudo mostram que uma parcela razoável das crianças já apresenta esses cocos cariogênicos antes da erupção da dentição decídua e que a microbiota bucal está em amplo e rápido processo de formação, não existindo áreas virgens de fato.

Os dados não invalidam o conceito de janela de infectividade, mas evidenciam, que, possivelmente, existem janelas, maiores e menores, que permitem a implantação desses microrganismos na cavidade bucal. Nossos dados também mostraram que existe uma estreita correlação entre a população de cocos cariogênicos e o processo de erupção dentária, além do fato de que as crianças que desenvolveram processo de cárie possuíam, níveis mais elevados desses microrganismos, e que essa janela de infectividade pode sofrer influências de fatores ambientais e culturais, o que tornaria a população, ou melhor, populações brasileiras

em uma condição especial para pesquisa, visto que somos uma sociedade bastante complexa e com muitas peculiaridades.

Por outro lado, se um grupo pequeno adquiriu *S. mutans* e *S. sobrinus* precocemente, a maioria das crianças (aproximadamente 60%) mostrou-se livre desses microrganismos aos 24 meses de idade e esses resultados são significativamente diferentes dos reportados por Caufield et al. (1993), que empregaram uma metodologia menos sensível, a cultura, em que 82,61% das crianças estavam colonizadas aos 26 meses de idade, ou os resultados de Tanner et al. (2002), em que *S. mutans* e *S. sobrinus* estiveram presentes em 55% e 47% das crianças com 6-18 meses e em 75% e 46% das crianças com 19-36 meses, ou, por fim, os dados de prevalência de Kishi et al. (2009), em que a quase totalidade de crianças com 2,5 anos era portadora desses cocos. Os dados aqui apresentados, por outro lado, foram semelhantes aos descritos por Alves et al. (2009), em que os primeiros cocos cariogênicos parecem ser transitórios e aos 24-30 meses, 32,1% eram colonizados por *S. mutans*.

Embora não tenhamos estudado, de fato, a transmissão de microrganismos bucais entre mães e filhos, o presente estudo sugere que a transmissão de cocos cariogênicos entre mães e filhos é um evento que não ocorre com facilidade e que a transmissão demanda contato freqüente, visto que a maioria das crianças estava livre desses cocos enquanto suas mães eram sempre, ou quase sempre, colonizadas por níveis moderados desses cocos. Esse ponto de vista está de acordo com os resultados de Emanuelson et al. (1998) e de Emanuelson e Thornqvist (2001).

Embora a dieta alimentar da criança não tenha influenciado a prevalência desses cocos, os maiores níveis de *S. mutans* e *S. sobrinus* ocorreram em duas crianças que desenvolveram o processo carioso e apresentaram uma modificação na dieta alimentar, com aumento no consumo de alimentos considerados cariogênicos. Esses dados confirmam a possibilidade de utilizar com precisão o real-time PCR para avaliar as populações de cocos cariogênicos e, portanto o risco à cárie do indivíduo, como sugerido por Kishi et al. (2009).

A proporção de *S. mutans* / *S. sobrinus* na população foi semelhante à observada previamente por Okada et al. (2002), sendo que os níveis salivares de *S. mutans* foram mais elevados do que os de *S. sobrinus*, concordando com os dados de Kishi et al. (2009), os quais também utilizaram a metodologia de Yoshida et al.

(2003) na quantificação desses cocos cariogênicos em função da sua reprodutibilidade, confiabilidade e, acima de tudo, sensibilidade. Apesar dessa superioridade numérica, alguns estudos atribuem a *S. sobrinus* uma participação importante em pacientes com elevada atividade de cárie (FUJIWARA et al., 1991; HIROSE et al., 1993), o que não foi observado nas crianças que desenvolveram cárie dentária.

Por outro lado, Okada et al. (2002) verificaram que os pacientes infectados por *S. mutans* e *S. sobrinus*, em associação, apresentavam maior prevalência de cárie e atividade de doença do que os pacientes que albergavam apenas *S. mutans*. No presente estudo, todas as duas crianças com cárie eram portadoras, em algum momento, desses dois cocos cariogênicos, mas em função do modesto número de pacientes que desenvolveram essa condição, essa constatação de co-infecção não atinge significância estatística.

6.2 Associação Clínica

Considerando os resultados e a discussão dos aspectos microbiológicos, importantes relações podem ser descritas em relação ao aspecto clínico deste trabalho. A começar pelo fato de ser uma pesquisa longitudinal o que empresta aos resultados uma sólida característica e oferecem maior precisão nas inferências causais sendo os mais adequados para testar as hipóteses etiológicas. Embora este tipo de estudo possa ser seriamente afetado pela perda de indivíduos da amostra, nesta pesquisa o número amostral manteve-se em níveis razoáveis, pois ao final de 2 anos foi mantido 77% do número inicial de pacientes.

Em função destas alterações, do número de pacientes e amostras clínicas, a análise estatística dos dados foi realizada segundo Brunner; Langer (2000), e Rosa (2001), em dois compartimentos separados: aspectos clínicos e aspectos microbiológicos. Quando da inter-relação entre estes compartimentos, considerava-se apenas os dados dos indivíduos que haviam de fato concluído toda a avaliação clínica e microbiológica pertinente.

Em nosso estudo, aos 6 e 12 meses de idade, não foi observada influência da dieta alimentar, aleitamento, irrupção dentária e qualidade da higienização, na microbiota bucal observada. Provavelmente, porque o consumo de alimentos açucarados manteve-se de forma moderada, os dentes erupcionados encontravam-se hígidos e as características de higienização bucal eram semelhantes. Aos 18 meses de idade, nas crianças avaliadas, foi observada sensível diferença na presença de cocos cariogênicos, em duas crianças que desenvolveram lesão de cárie em esmalte sem cavitação (mancha branca), e com mudança no padrão de consumo de alimentos açucarados de moderado para alto. Porém, na avaliação geral, estas alterações não refletiram significativamente uma vez que não foram observadas influências do tipo de dieta alimentar, aleitamento e frequência da higienização na microbiota bucal dos bebês. Nestas mesmas crianças, quando avaliadas aos 24 meses, pode-se considerar que os mesmos padrões foram observados, uma vez que não houve mudança no padrão de consumo de alimentos contendo açúcar, e a prevalência de cárie dentária não foi estatisticamente significativa. A presença de microrganismos nesta faixa etária, portanto, não foi

influenciada significativamente pelos padrões de dieta alimentar e higiene, mas sim, pelo número de dentes irrompidos.

Verificou-se também, ao longo dos dois anos de acompanhamento clínico, que os fatores estudados nesta pesquisa, irrupção dentária, condição gengival, higiene bucal, dieta alimentar e cárie dentária, apresentaram padrões considerados desejados para as faixas de idade pesquisadas e por serem pacientes pertencentes a um programa educativo/preventivo.

A irrupção dentária apresentou variabilidade, sendo que no período final de avaliação nem todos os pacientes apresentavam toda a dentadura decídua estabelecida. Em nossos achados, o aumento no número de dentes na cavidade bucal influenciou a elevação do número de microrganismos. Assim também, Tankkunnasombut et al. (2009) ao estudarem 202 crianças tailandesas de 2 a 36 meses de idade encontraram 26% das crianças (média 20 meses), com resultados positivos para *S. mutans*. O fator que mais concorreu para uma significativa elevação destes cocos foi o aumento da idade e número de dentes irrompidos. Segundo os autores, o maior número de dentes presentes na cavidade bucal incluindo-se a irrupção dos molares decíduos são potenciais fatores de risco à cárie dentária em pacientes nesta faixa etária.

A condição gengival, em estreita relação com a higiene bucal, foram fatores que se mantiveram dentro de padrões considerados normais, enfatizando-se a ocorrência de microrganismos causadores de periodontopatias, ainda que transitórios. A combinação da escovação dentária mais a higiene da área interproximal são considerados ótimos métodos de controle do acúmulo do biofilme, evitando assim a condição de gengivite. Porém, os pacientes assistidos na bebê-clínica são amplamente dependentes das ações dos pais ou responsáveis para realizar sua higiene bucal. Como afirma Alves et al. (1998), estes hábitos de higiene são introduzidos tardiamente como rotina na vida da criança. Por isso, assim como afirma Claydon (2008), a melhora na higiene bucal, tanto da criança como da mãe, é obtida pelo desenvolvimento da aptidão e motivação, fatores estes imprescindíveis na rotina da bebê-clínica.

Quanto à dieta alimentar, nos pacientes desta pesquisa notou-se um perfil que se desenvolveu dentro dos padrões normais, porém não ideais. Aos seis meses de idade somente 37% dos bebês eram amamentados exclusivamente no peito, enquanto hábitos de alimentação não adequados como acordar para mamar e

dormir mamando era praticado por 33% dos bebês, embora aos 12 meses estivessem ausentes. Provavelmente fruto das orientações fornecidas à mãe. Tankkunnasombut et al. (2009) analisando crianças nos três primeiros anos de vida, encontrou correlação do tipo de leite e uso da mamadeira com uma maior colonização de *S. mutans*. Os autores ressaltaram que no caso da mamadeira, o tempo de uso da mesma pela criança é fator que corrobora o resultado. Em nossa pesquisa não foi encontrada influência do tipo da dieta alimentar e da microbiota.

Ismail e Sohn (2001) afirmaram com relação à experiência de cárie, que variáveis como nível sócio-econômico, dieta alimentar, hábitos de higiene e período da primeira consulta ao cirurgião-dentista, não podem ser consideradas isoladamente.

Estes mesmos autores ainda afirmam que crianças que tem visitas preventivas em idade precoce, como as que ocorrem com as crianças inscritas em programas educativo-preventivos, geralmente são pertencentes a famílias de melhores condições sócio-econômicas, que podem gerar maior interesse e comportamentos positivos relacionados aos aspectos preventivos e orientações profissionais.

O fato de o consumo de alimentos açucarados não estar necessariamente associado com a prevalência de cárie dentária foi resultado também encontrado nos trabalhos de Garcia- Closas et al. (1997), que avaliaram a prevalência de cárie dentária em crianças, associando ao consumo de vários tipos de alimentos, principalmente açucarados, e a contagens salivares de *Streptococcus mutans*. Estes autores verificaram, por outro lado, que o consumo associado de alimentos contendo carboidratos e açúcares influenciou significativamente a prevalência de cárie nos pacientes com contagens de moderada a alta de *S. mutans*, porém, não nas com contagens baixas. Estes autores afirmam que isto se deve a maior retenção deste tipo de alimento na boca, e ao aumento gerado na produção de ácidos bucais.

Kalsbeek e Verrips (1994) avaliaram crianças de 5, 8 e 11 anos de idade, e não encontraram diferença estatisticamente significativa entre grupos de faixas de ingestão de alimentos açucarados e índices de cárie. Houve apenas diferença significativa entre o grupo de alto consumo e grupo de menor consumo, porém poucas crianças se enquadravam neste primeiro grupo. Com relação aos hábitos de higiene, houve pouca correlação entre escovação e índice de cárie isoladamente, nas faixas etárias avaliadas.

Através dos dados acima expostos, correlacionando-os com os achados literários de Alaluusua e Malmivirta (1994), Fraiz e Walter (2001) e Ohlund et al. (2007), a prevalência de cárie dentária pode não ser somente influenciada pela ingestão de alimentos açucarados, quando há o registro semanal dos mesmos. Além de que o consumo destes pode ser considerado de pouca influência, uma vez que há grande variedade de outros alimentos não-cariogênicos ingeridos pela criança no período. Outro fator que influencia é o histórico de exposição ao flúor por estas crianças (OHLUND et al., 2007).

Podemos encontrar ainda na literatura, autores que demonstraram associação positiva entre o consumo de alimentos açucarados e a prevalência de cárie dentária (LLENA; FORNER, 2008; ROSENBLATT e ZARZAR, 2004; VALLE et al., 2001). Nelson Filho et al. (2001) encontraram correlação entre ingestão de alimentos entre as refeições e prevalência de cárie, porém sem correlação com hábitos de higiene, como também verificaram Karjalainen et al. (2001), em crianças de três a seis anos de idade.

Llena e Forner (2008) afirmaram que o consumo de aperitivos tende a aumentar com a idade, e este geralmente está associado à queda na frequência de escovação. Os autores encontraram associação positiva entre experiência de cárie e frequência semanal de consumo de aperitivos açucarados, pães industrializados e refrigerantes, porém, não conseguiram fazer a confirmação destes dados por regressão logística.

Rosenblatt e Zarzar (2004) ainda afirmam que a prevalência de cárie dentária tende a aumentar com a idade, provavelmente devido ao aumento de dentes irrompidos, como foi observado em nossos estudos, e confirmados pela avaliação microbiológica. Além disso, segundo estes autores, fatores que influenciariam seriam mudanças na qualidade da dieta alimentar e tendência à diminuição nos cuidados de higienização, já que as crianças conforme vão crescendo tendem a querer se responsabilizar por sua higienização bucal, porém nem sempre tendo capacidade motora para tanto.

Como cada vez mais precocemente os bebês têm aderido aos hábitos de dieta alimentar familiar, as ações referentes às orientações de dieta alimentar são realizadas com muita frequência, entretanto por tratar-se de um assunto que sofre no seio da família influências de diversos setores, seguir um comportamento sugerido pelo profissional ou alterá-lo quando necessário nem sempre é simples.

Destaque-se que 92% dos pacientes nesta pesquisa não desenvolveram sinal clínico da lesão de cárie dentária, e que a prevalência de cocos cariogênicos nestes pacientes foi baixa e significativamente mais elevada nas mães. Estes dados permitem-nos inferir a influência positiva das ações do programa educativo e preventivo da Bebê-Clínica. Entretanto, aponta-nos para a urgente necessidade de também direcionarmos nossos esforços para envolvermos os pais nestas ações.

Ficou claro, embora não tenha sido o escopo principal desta pesquisa, que a pessoa que passa mais tempo com o bebê, no caso a mãe, parece ser a fonte potencial de transmissão dos microrganismos e, portanto, da mesma forma que os bebês, necessitam de ações que visem reduzir seus níveis de microrganismos. Pela característica do atendimento da Bebê-Clínica, oferecer as ações educativas/preventivas de forma conjunta é muito oportuno e necessário.

Os resultados do estudo de Aaltonen et al. (1985) mostraram que crianças cujas mães apresentavam altas contagens de *S. mutans* durante a fase pré-dentada da criança e baixos valores para essas bactérias durante a fase dentada, foram significativamente menos propensas à cárie dentária que outras que foram expostas a uma baixa imunização e alto desafio infectivo. Vale lembrar que os dois últimos períodos analisados nos bebês nesta pesquisa, foram os de maior elevação na prevalência dos microrganismos, assim como estabelecido pela literatura (BARROS et al., 2001; KARJALAINEN et al., 2001; PAPAIOANNOU et al., 2009). Devido a estas ocorrências biológicas, e sem dúvida, a outros fatores próprios da etiologia da cárie dentária, muitos trabalhos afirmam que a faixa etária dos 18 a 36 meses de vida, seja crítica para a ocorrência de lesão cariosa (CAUFIELD et al., 1993; ROSENBLATT; ZARZAR, 2002; WALTER et al., 1996).

Um grupo de professores de Biologia Oral e Biologia Molecular da UCLA em Los Angeles – Califórnia, USA, dissertando sobre a abordagem médica da cárie dentária ressalta a necessidade de se travar uma luta contra a doença e não contra a lesão. Acrescentam que os odontopediatras são capazes de adotar, com os novos conhecimentos e tecnologias, abordagens mais dinâmicas na prevenção da cárie dentária, através de monitorar/acompanhar a microbiota dos cuidadores, assim prevenindo a colonização de bactérias patogênicas na criança.

O conhecimento do ciclo natural de uma doença é a melhor estratégia de controle e prevenção da mesma. Nesse sentido, Köhler et al. (1983) e Köhler et al. (1988) elaboraram políticas que possibilitaram a redução da ocorrência de cárie em

crianças suecas nos anos 80. Essas estratégias se baseavam na redução da transmissão vertical de estreptococos cariogênicos através da redução dos níveis salivares desses microrganismos nas mães e cuidadores, particularmente quando as crianças se encontram em uma fase crítica para a aquisição dos principais microrganismos associados à cárie dentária e, da mesma forma, às periodontopatias. Nesse sentido, o controle de dieta alimentar, de forma mais efetiva do que praticado pela maioria das mães, poderia ter grande impacto sobre a cárie dentária dos filhos e mesmo sobre a formação do biofilme, uma vez que uma dieta alimentar cariogênica talvez seja mais importante do que a própria proporção de cocos cariogênicos, a qual também influencia a microbiota, sendo que uma redução da dieta alimentar industrializada, tanto em termos de consistência quanto conteúdo de sacarose, o qual aumenta significativamente a formação de biofilme, com todas as conseqüências do fato, como um aumento nas áreas de biofilme espesso e pobre em oxigênio, em que anaeróbios Gram-negativos periodontopatogênicos poderiam se estabelecer (BAUMGARTNER et al., 2009).

É inquestionável a necessidade de intervenção precoce para a prevenção da cárie dentária, uma vez que hábitos alimentares e de higiene bucal são constituídos precocemente, nos primeiros anos de vida da criança (GRINDEFJORD et al., 1991; WALTER et al., 1996). Assim como, neste período, são estabelecidos alguns dos microrganismos mais importantes para a formação do biofilme periodontopatogênico, como *F. nucleatum*. Como o controle do biofilme já é medida adotada nas Clínicas de atendimento odontológico a bebês, medidas para controle do biofilme, particularmente nas mães são extremamente oportunas.

Conclusões

7 Conclusões

- ✓ O fator erupção dentária foi mais importante que os hábitos de dieta alimentar e higiene para a prevalência dos microrganismos;
- ✓ Independentemente da microbiota detectada, os tecidos periodontais das crianças apresentavam-se em condições de normalidade;
- ✓ Os níveis mais elevados de *S. mutans* e *S. sobrinus* foram verificados nas crianças que apresentaram dieta alimentar cariogênica e lesão de cárie dentária;
- ✓ A aquisição de microrganismos periodontais ocorreu em etapas, sendo que *Fusobacterium nucleatum* e actinomicetos se implantaram precocemente na cavidade bucal, enquanto que *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *T. denticola* e *P. gingivalis* mostraram ocorrência transitória;
- ✓ Embora *P. intermedia*, *E. corrodens* e *C. rectus* tenham se mostrado prevalentes, a estabilidade de colonização por estes microrganismos foi pequena, sugerindo transitoriedade;
- ✓ A avaliação da microbiota bucal dos bebês aos 6, 12, 18 e 24 meses e de suas mães apresentou indício de transmissibilidade materna e contaminação salivar.

Referências

8 Referências

AALTONEN, A. S.; TENOVUO, J. Association between mother- infant salivary contacts and caries resistance in children, a cohort study. **Pediatr. Dent.**, v. 16, n. 2, p. 110- 115, 1994.

ABREU, E. G.; LÓPEZ, A. R.; ESTRADA, E. C. Relación entre el grado de infección por streptococcus mutans y La posterior actividad cariogénica. **Rev. Cubana Estomatol.**, v. 37, n. 3, p. 157- 61, 2000.

ALALUUSUA, S.; ASIKAINEN, S. Detection and distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the primary dentition. **J. Periodontol.**, v. 59, n. 8 , p. 504-507, 1988.

ALALUUSUA, S.; MALMIVIRTA, R. Early plaque accumulation – a sign for caries risk in young children. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 22, n. 5 , p. 273-276, 1994.

ALALUUSUA, S.; RENKONEN, O. V. Streptococcus mutans establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 91, n. 6, p. 453- 457, 1983.

ALBANDAR, J. M.; RAMS, T. E. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. **Periodontol. 2000**, v. 29, n. 1, p. 7- 10, 2002.

ALBANDAR, J. M.; TINOCO, E. M. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. **Periodontol.** **2000**, v. 29, p. 153- 176, 2002.

ALVES, A. C. et al. Prospective study of potential sources of Streptococcus mutans transmission in nursery school children. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, pt. 4, p. 476- 481, 2009.

ALVES, T. D. B.; MONTANDON, E. M.; MENEZES, V. A. Levantamento epidemiológico em crianças de 0 a 30 meses na cidade de Recife-PE: Parte 1: Avaliação da dieta e higiene bucal. **ROBRAC**, v. 7, n. 23, p. 44-9, 1998.

ANGELOV, N. et al. Recovery of putative pathogens from paper point sampling at different depths of periodontal lesions. **Clin. Cosm. Invest. Dent.**, v. 1, p. 1- 5, 2009.

ARTHUR, R. A. et al. Genotypic diversity of S. mutans in dental biofilm formed in situ under sugar stress exposure. **Braz. Dent. J.**, v. 18, n. 3, p. 185-191, 2007.

ASIKAINEN, S; CHEN, C.; SLOTS, J. Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in families with periodontitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 11, n. 6, p. 387- 394, 1996.

BACA P. et al. Genotypes of Streptococcus mutans in saliva versus dental plaque. **Arch. Oral Biol.**, v. 53, n. 8, p. 751-754, 2008.

BARROS, S. G. et al. Contribuição ao estudo da cárie dentária em crianças de 0 a 30 meses. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 15, n. 3, p. 215-222, 2001.

BAUMGARTNER, S. et al. The impact of the stone age diet on gingival conditions in the absence of oral hygiene. **J. Periodontol.**, v. 80, n. 5, p. 759-768, 2009.

BERKOWITZ, R. J. Mutans streptococci: acquisition and transmission. **Pediatr. Dent.**, v. 28, n. 2, p. 106- 109, 2006.

BERKOWITZ, R. J.; JORDAN, H. V.; WHITE, G. The early establishment of *Streptococcus mutans* in the mouths of infants. **Arch. Oral Biol.**, v. 20, n. 3, p.171-174, 1975.

BIJELLA, V. T. et al. Prevalência de cárie, doença periodontal e má-oclusão em crianças de zero a seis anos, no município de Bauru, estado de São Paulo. Determinação social do processo saúde-doença. Parte I: cárie e doença periodontal. **CECADE News**, v. 3, n. 1, p. 1- 11, 1995.

BONECKER, M. J. S.; GUEDES-PINTO, A. C.; WALTER, L. R. F. Prevalência, distribuição e grau de afecção de cárie dentária em crianças de 0 a 30 meses de idade. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, v. 51, n. 6, p. 535-540, 1997.

BOTERO, J. E. et al. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 4, p. 696-704, 2007.

BOUTAGA, K. et al. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. **J. Clin. Periodontol.**, v. 33, n. 6, p. 427-433, 2006.

BRAILSFORD, S. R. et al. The predominant *Actinomyces* spp. isolated from infected dentin active root caries lesions. **J. Dent. Res.**, v. 78, n. 9, p. 1525-1534, 1999.

BRAMBILLA, E.; GARCIA-GODOY, F.; STROHMENGER, L. Principles of diagnosis and treatment of high-carries-risk subjects. **Dent. Clin. North Am.**, v. 44, n. 3, p. 507-540, 2000.

BRUNNER, E.; LANGER, F. Nonparametric analysis of ordered categorical data in designs with longitudinal observations and small sample sizes. **Biometric Journal**, v. 42, p. 663- 675, 2000.

BUENO, L. C.; MAYER, M. P. A.; DIRIENZO, J. M. Relationship between conversion of localized juvenile periodontitis-susceptible children from health to disease and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter structure. **J. Periodontol.**, v. 69, n. 9, p. 998-1007, 1998.

BUSSCHER, H. J.; EVANS, L. V. **Oral biofilm and plaque control**. Amsterdam: Harwood Academic, 1998. 348 p.

CARIÑO, K. M. G.; SHINADA, K. KAWAGUCHI, Y. Early childhood caries in Northern Philippines. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 31, n. 2, p. 81- 89, 2003.

CARVALHO, R. P. M. et al. Relationship of neutrophil phagocytosis and oxidative burst with the subgingival microbiota of generalized aggressive periodontitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 24, n. 2, p. 124-132, 2009.

CATALANOTTO F. A.; SHKLAIR I. L.; KEENE H. J. Prevalence and localization of *Streptococcus mutans* in infants and children. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 91, n. 3, p. 606-609, 1975.

CAULFIELD, 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.**, v. 72, n. 1, p. 37- 45, 1993.

CLAYDON, N. C. Current concepts in toothbrushing and interdental cleaning. **Periodontol.** 2000, v. 48, p. 10- 22, 2008.

CLEATON-JONES, P.; WILLIAMS, S.; FATTI, P. Surveillance of primary dentition caries in Germiston, South Africa, 1981-97. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 28, n. 4 , p. 267-273, 2000.

COLE, M. F. et al. Humoral immunity to commensal oral bacteria in human infants: salivary antibodies reactive with *Actinomyces naeslundii* genospecies 1 and 2 during colonization. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 9, p. 4283-4289, 1998.

COLOMBO, A. P. V. et al. Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9 month results. **J. Periodontol.**, v. 76, n. 5, p. 778-784, 2005.

COLOMBO, A. P. V. et al. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 73, n. 4, p. 360-369, 2002.

CORTELLI, J. R. et al. Etiological analysis of initial colonization of periodontal pathogens in oral cavity. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 4, p. 1322–1329, 2008.

CORTELLI, J. R. et al. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n. 8, p. 860-866, 2005.

CUNHA, R. F. et al. Dentistry for babies: a preventive protocol. **ASDC J. Dent. Child.**, v. 67, n. 2, p. 89- 92, 2000.

DAHLÉN, G.; LEONHARDT, A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.21, n. 1, p. 6-11, 2006.

DARBY, I.; CURTIS, M. Microbiology of periodontal disease in children and young adults. **Periodontol. 2000**, v. 26, p. 33-53, 2001.

DAVENPORT, E. S. et al. The effects of diet, breast-feeding and weaning on caries risk for pre-term and low birth weight children. **Int. J. Paediatr. Dent.**, v. 14, n. 4, p. 251-259, 2004.

DEMMER, R. T. et al. Bleeding on probing differentially relates to bacterial profiles: the oral infections and vascular disease epidemiology study. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, n. 6, p. 479-486, 2008.

DE SOET, J. J. et al. Host and microbiological factors related to dental caries development. **Caries Res.**, v. 42, n. 5, p. 340-347, 2008.

DINI, E. L.; HOLT, R. D.; BEDI, R. Caries and its association with infant feeding and oral health- related behaviors in 3-4- year old Brazilian children. **Community. Dent. Oral Epidemiol.**, v. 28, n. 4, p. 241-248. 2000.

DOGAN, B. et al. Consistent intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* despite clonal diversity. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 2, p. 307-315, 2008.

DOGAN, B. et al. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 6, p. 803-814, 2003.

DOWSETT, S. A.; ECKERT, G. J.; KOWOLIK, M. J. Comparison of periodontal disease status of adults in two untreated indigenous population of Guatemala, Central America. **J. Clin. Periodontol.**, v. 29, n.8, p. 784-787, 2002.

EBERSOLE, J. L. et al. Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in hispanic Americans with type 2 diabetes. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 4, p. 637-646, 2008.

EGUCHI, T. et al. Microbial changes in patients with acute periodontal abscess after treatment detected by Pado Test. **Oral Dis.**, v. 14, n. 2, p. 180-184, 2008.

EMANUELSSON, I. M. R.; THORNQVIST, E. Distribution of mutans streptococci in families: a longitudinal study. **Acta Odontol. Scand.**, v. 59, n. 2, p. 93–98, 2001.

EMANUELSSON, I. R.; LI, Y.; BRATTHALL, D. Genotyping shows different strains of mutans streptococci between father and child and within parental pairs in Swedish families. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 13, n. 5, p. 271-277, 1998.

ERSIN, N. K. et al. Transmission of *Streptococcus mutans* in a group of Turkish families. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.19, n. 6, p. 408-410, 2004.

FENG, Z.; WEINBERG, A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. **Periodontol.** 2000, v. 40, p. 50- 76, 2006.

FIVES-TAYLOR, P.; MEYER, D.; MINTZ, K. Virulence factors of the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Periodontol.**, v. 67, n. 3, suppl., p. 291-297, 1996.

FRAIZ, F. C. **Estudo dos fatores associados à cárie dentária em crianças que recebem atenção odontológica precoce (Odontologia para bebês)**. 1998. 108 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

FRAIZ, F. C.; WALTER, L. R. F. Study of factors associated with dental caries in children who receive early dental care. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 15, n. 3, p. 201-207, 2001.

FRISKEN K. W.; HIGGINS T.; PALMER J. M. The incidence of periodontopathic microorganisms in young children. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 5, n. 1, p.43-45, 1990.

FRISSE, G. M.; BEZERRA, A. C. B.; TOLEDO, O. A. Correlação entre hábitos alimentares e cárie dentária em crianças de 6 a 36 meses de idade. **JBP J. Bras. Odontopediatr. Odontol. Bebê**, v. 1, n. 2, p. 17- 26, 1998.

FUJIWARA T. et al. Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0–2-year-old children of Japan. **Comm. Dent. Oral Epidemiol.**, v. 19, p. 151- 4, 1991.

GAETTI-JARDIM JÚNIOR E. et al. Distribution of biotypes and leukotoxic activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolated from Brazilian patients with chronic periodontitis. **Braz. J. Microbiol.**, v. 39, n. 4, p. 658-663, 2008.

GAETTI-JARDIM JÚNIOR, E. et al. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients with chronic periodontitis, aggressive periodontitis, healthy subjects, and children with gingivitis in two cities of the State of São Paulo, Brazil. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 14, n. 3, p. 153-156, 2006.

GAETTI-JARDIM JÚNIOR, E. et al. O tabagismo como fator de risco para as doenças periodontais: aspectos microbiológicos. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v. 12, n. 4, p. 315-321, 1998.

GAFAN, G.P et al. Prevalence of periodontal pathogens in dental plaque of children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 9, p. 4141-4146, 2004.

GARCIA-CLOSAS, R.; GARCIA-CLOSAS, M.; SERRA-MAJEM, L. A cross-sectional study of dental caries, intake of confectionery and foods rich in starch and sugars, and salivary counts of *Streptococcus mutans* in children in Spain. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 66, n. 5, p. 1257-1263, 1997.

GRINDEFJORD, M. Et al. Prevalence of mutans streptococci in one-year-old children. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 6, n. 5, p. 280-283, 1991.

GRIPP, V. C.; SCHLAGENHAUF, U. Prevention of early mutans streptococci transmission in infants by professional tooth cleaning and chlorhexidine varnish treatment of the mother. **Caries Res.**, v. 36, n. 5, p. 366-372, 2002.

HAFFAJEE, A. D.; TELE, R. P.; SOCRANSKY, S. S. Association of *Eubacterium nodatum* and *Treponema denticola* with human periodontitis lesions. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 21, n. 5, p. 269-282, 2006.

HAFFAJEE, A. D. et al. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. **J. Clin. Periodontol.**, v. 31, n. 11, p. 996-1002, 2004.

HALLBERG, K. et al. *Actinomyces naeslundii* displays variant fimP and fimA fimbrial subunit genes corresponding to different types of acidic proline rich protein and beta-linked galactosamine binding specificity. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 9, p. 4403-4410, 1998.

HAMLET, S. et al. Persistent colonization with *Tannerella forsythensis* and loss of attachment in adolescents. **J. Dent. Res.**, v. 83, n. 3, p. 232- 235, 2004.

HARALDSSON, G.; HOLBROOK, W.P.; KÖNÖNEN, E. Clonal persistence of oral *Fusobacterium nucleatum* in infancy. **J. Dent. Res.**, v. 83, n. 6, p. 500- 504, 2004.

HARASZTHY, V. I. et al. Molecular cloning of the fur gene from *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 6, p. 3170-3179, 2002.

HAUBEK, D. et al. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. **Lancet**, v. 371, n. 9608, p.237-242, 2008.

HERRERA, D. et al. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, n. 2, p. 106-113, 2008.

HINTAO, J. et al. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 22, n. 3, p. 175-181, 2007.

HIROSE H. et al. Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth-surface caries increment. **Caries Res.**, v. 27, n. 4, p. 292- 297, 1993.

IDE, L. et al. Occurrence of seven putative periodontal pathogens in the subgingival plaque of two native populations in the Xingu Indian park. **Anaerobe**, v. 6, n. 3, p. 135-137, 2000.

ISMAIL, A. I.; SOHN, W. The impact of universal access to dental care on disparities in caries experience in children. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 132, n. 3, p. 295- 303, 2001.

KALSBECK, H.; VERRIPS, G. H. Consumption of sweet snacks and caries experience of primary school children. **Caries Res.**, v. 28, n. 6, p. 477-83, 1994.

KAMMA, J. J. et al. Profile of subgingival microbiota in children with primary dentition. **J. Periodontal Res.**, v. 35, n.1, p. 33- 41, 2000.

KARJALAINEN, S. et al. A prospective study on sucrose consumption, visible plaque and caries in children from 3 to 6 years of age. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 29, n. 2, p. 136-142, 2001.

KASTE, L. M.; GIFT, H. C. Inappropriate infant bottle feeding. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.**, v. 149, n. 7, p. 786-791, 1995.

KISHI, M. et al. Relationship of quantitative salivary levels of Streptococcus mutans and S. sobrinus in mothers to caries status and colonization of mutans streptococci in plaque in their 2.5-year old children. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 37, n. 3, p. 241-249, 2009.

KLEIN, M. I. et al. Longitudinal study of transmission, diversity and stability of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus genotypes in Brazilian nursery children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 10, p. 4620-4626, 2004.

KOHLER B.; ANDREEN, I.; JONSSON, B. The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at 4 years of age. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 3, n. 1, p. 14- 17, 1988.

KOHLER, B. et al. Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium Streptococcus mutans in their infants. **Arch. Oral Biol.**, v. 28, n. 3, p. 225- 231, 1983.

KOLENBRANDER, P. E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 11, p. 3247- 3252, 1993.

KÖNÖNEN, E.; ASIKAINEN, S.; JOUSIMIES-SOMER, H. The early colonization of gram-negative anaerobic bacteria in edentulous infants. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 7, n. 1, p. 28-31, 1992.

KONONEN E. et al. Establishment of oral anaerobes during the first year of life. **J. Dent. Res.**, v. 78, n. 10, p. 1634-1639, 1999.

KÖNÖNEN, E. et al. The oral gram-negative anaerobic microflora in young children: longitudinal changes from edentulous to dentate mouth. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 9, n. 3, p. 136-141, 1994.

KÖNÖNEN, E. et al. The *Prevotella intermedia* group organisms in young children and their mothers as related to maternal periodontal status. **J. Periodontal Res.**, v. 35, n. 6, p. 329-334, 2000.

KULEKCI, G. et al. Salivary detection of periodontopathic bacteria in periodontally healthy children. **Anaerobe**, v. 14, n. 1, p. 49- 54, 2008.

KUMAR, P. S. et al. New bacterial species associated with chronic periodontitis. **J. Dent. Res.**, v. 82, n. 5, p. 338-344, 2003.

LAFURIE, G. I. et al. Demographic, clinical and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 4, p. 629-639, 2007.

LAMELL, C. W. et al. Acquisition and colonization stability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 3, p. 1196- 1199, 2000.

LEMBO, F. L. et al. Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 22, n. 5, p. 313-319, 2007.

LEUNG, W. K. et al. Characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from young Chinese aggressive periodontitis patients. **J. Periodontal Res.**, v. 40, n. 3, p. 258-268, 2005.

LINDQUIST, B.; EMILSON, C. G. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. **Caries Res.**, v. 38, n. 2, p. 95-103, 2004.

LINGSTROM, P. et al. Dietary factors in the prevention of dental caries: a systematic review. **Acta Odontol. Scand.**, v. 61, n. 6, p. 331-340, 2003.

LLENA, C.; FORNER, L. Dietary habits in a child population in relation to caries experience. **Caries Res.**, v. 42, n. 5, p. 387- 393, 2008.

LOPEZ, L. et al. Mutans streptococci prevalence in Puerto Rican babies with cariogenic behaviors. **Pediatr. Dent.**, v. 22, n. 4, p. 299-301, 2000.

MAEDA, H. et al. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella*

intermedia, *tetQ* gene and total bacteria. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 39. N. 1, p. 81- 86, 2003.

MARTÍNEZ-PABÓN, M. C. et al. Detection of *Treponema denticola* in saliva obtained from patients with various periodontal conditions. **Clin. Oral Investig.**, v. 12, p. 73- 81, 2008.

MATEE, M. I. N. et al. Mutans streptococci and lactobacillus in breast- fed children with rampant caries. **Caries Res.**, v. 26, n. 3, p. 183- 187, 1992.

MATTO, J. et al. Detection of Porphyromonas gingivalis from saliva by PCR by using a simple-sample processing method. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 1, p. 157- 160, 1998.

MATTOS-GRANER, R. O. et al. Caries prevalence in 6- 36- month- old Brazilian children. **Community Dent. Health**, v. 13, n. 2, p. 96- 98, 1996.

MATTOS-GRANER, R. O. et al. Genotypic diversity of mutans streptococci in brazilian nursery children suggests horizontal transmission. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 6, p. 2313–2316, 2001.

MATTOS-GRANER, R. O et al. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. **J. Dent. Res.**, v. 79, n. 6, p. 1371- 1377, 2000.

MAYANAGI, G. et al. Detection frequency of periodontitis associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, n. 6, p. 379-385, 2004.

MCCLELLAN, D. L.; GRIFFEN, A. L.; LEYS, E. J. Age and prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 8, p. 2017-2019, 1996.

MELHADO, F. L. **Avaliação de um programa de prevenção aplicado em crianças de 5 a 8 anos de idade provenientes da Bebê-Clínica da F.O.A.- UNESP.** 2003. 127 f. Tese (Doutorado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2003.

MILGROM, P. et al. Dental caries and its relationship to bacterial infection hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6- to 36- month- old children. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 28, n. 4, p. 295- 306, 2000.

MIURA, M. et al. The prevalence and pathogenic differences of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in patients with aggressive periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 40, n. 2, p. 147-152, 2005.

MIYAMOTO, E. et al. Bacterial profiles of oral streptococcal and periodontal bacterial species in saliva specimens from Japanese subjects. **Arch. Oral Biol.**, v. 54, n. 4, p. 374-379, 2009.

MOREIRA, M.; POLETTO, M. M.; VICENTE, V. A. Fatores determinantes na epidemiologia e transmissibilidade da doença cárie. **Rev. Odonto Ciênc.**, v. 22, n. 56, p. 181-185, 2007.

MORINUSHI, T. et al. The relationship between gingivitis and colonization by *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycescomitans* in children. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 3, p. 403-409, 2000.

NAKANO, R. et al. Distribution of 10 periodontal bacterial species in children and adolescents over a 7-year period. **Oral Dis.**, v. 14, n. 7, p. 658-664, 2008.

NELSON-FILHO, P. et al. Avaliação dos hábitos alimentares em crianças portadoras de cárie de mamadeira. **JBP J. Bras. Odontoped. Odontol. Bebê**, v. 4, n. 17, p. 30-35, 2001.

ÖHLUND, I. et al. Diet intake and caries prevalence in four-year-old children living in a low-prevalence country. **Caries Res.**, v. 41, n. 1, p. 26-33, 2007.

OHO, T. et al. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 15, n. 4, p. 258-262, 2000.

OKADA, M.; HAYASHI, F.; NAGASAKA, N. Detection of *Actinobacillus actinomycescomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. **J. Clin. Periodontol.**, v. 27, n. 10, p. 763-768, 2002.

OOSHIMA, T. et al. Occurrence of periodontal bacteria in healthy children: a 2-year longitudinal study. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 31, n. 6, p. 417-425, 2003.

PACKER, B. N.; VALENTE, P. H. M.; BRETZ, W. A. Avaliação de fatores relacionados a transmissão de infecções pelos Estreptococcus do grupo mutans. **Rev. ABO Nac.**, v. 7, n. 2, p. 108-113, 1999.

PAPAIIOANNOU, W. et al. The microbiota on different oral surfaces in healthy children. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 24, n. 3, p. 183-189, 2009.

PAPAPANOU, P. N. et al. Periodontal microbiota and clinical periodontal status in a rural sample in southern Thailand. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 110, n. 5, p. 345-352, 2002.

PERSSON, G. R. et al. *Tannerella forsythia* and *Pseudomonas aeruginosa* in subgingival bacterial samples from parous women. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 3, p. 508-516, 2008.

PIMENTA, F. C. et al. Prevalence of mutans streptococci in 93 members from six Brazilian families. **Pesq. Odontol. Bras.**, v. 15, n. 3, p. 181-186, 2001.

PINTO, L. M. C. P. **Fatores associados com a experiência de cárie em crianças de 4 e de 6 anos de idade atendidas em um programa educativo-preventivo.** 2003. 100 f. Tese (Doutorado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2003.

RAMSEIER, C. A. et al. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 80, n. 3, p. 436-446, 2009.

RÊGO, R. O. C. C. et al. Transmission of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* between Brazilian women with severe chronic periodontitis and their children. **Braz. Dent. J.**, v. 18, n. 3, p. 220-224, 2007.

RIPA, L. W. Nursing caries: a comprehensive review. **Pediatr. Dent.**, v. 10, n. 4, p. 268-282, 1988.

ROETERS, F. J. M. et al. Lactobacilli, Mutans Streptococci and dental caries: a longitudinal study in 2-year-old children up to the age of 5 years. **Caries Res.**, v. 29, n. 4, p. 272-279, 1995.

ROSA, P. **Análise não-paramétrica de dados ordinais com medidas repetidas.** 2001. 100 f. Dissertação - IME, Universidade São Paulo, São Paulo, 2001.

ROSA, O. P. S. Níveis salivares de estreptococcus mutans e lactobacilos e susceptibilidade cárie dentária. **CECADE News**, v. 2, n. 1, p. 15-26, 1994.

ROSENBLATT, A.; ZARZAR, P. Breast-feeding and early childhood caries: an assessment among Brazilian infants. **Int. J. Paediatr. Dent.**, v. 14, n. 6, p. 439-45, 2004.

ROSENBLATT, A.; ZARZAR, P. The prevalence of early childhood caries in 12- to 36- month- old children in Recife, Brazil. **ASDC J. Dent. Child.**, v. 69, n. 3, p. 319-324, 2002.

RYLEV, M.; KILIAN, M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35 (8 Suppl), p. 346-361, 2008.

SAKAI, V. T. et al. Prevalence of four putative periodontopathic bacteria in saliva of a group of Brazilian children with mixed dentition: 1-year longitudinal study. **Int. J. Paediatr. Dent.**, v. 17, n. 3, p. 192-199, 2007.

SANZ, M. et al. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. **J. Clin. Periodontol.**, v. 31, n. 12, p. 1034- 47, 2004.

SARKONEN, N. **Oral *Actinomyces* species in health and disease: identification, occurrence and importance of early colonization.** 2007. 57 f. Dissertation - Faculty of Medicine, University of Helsinki, Helsinki, 2007.

SAYGUN, I. et al. Periodontitis lesions are a source of salivary cytomegalovirus and Epstein-Barr virus. **J. Periodontol. Res.**, v. 40, n. 2, p. 187- 191, 2005.

SHEN, S.; SAMARANAYAKE, L. P.; YIP H. K. Coaggregation profiles of the microflora from root surface caries lesions. **Arch. Oral Biol.**, v. 50, n. 1, p. 23-32, 2005.

SOCRANSKY, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, v. 25, n. 2, p. 134-144, 1998.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. **Periodontol.** **2000**, v. 38, p. 135- 187, 2005.

SPOLIDORIO, D. M. P. et al. Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in Brazilian family members. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, n. 3, p. 213-217, 2003.

SUDA, R. et al. Determination of eight selected periodontal pathogens in the subgingival plaque of maxillary first molars in Japanese school children aged 8- 11 years. **J. Periodontol. Res.**, v. 38, n.1, p. 28- 35, 2003.

SUDA, R. et al. Possible periodontal pathogens associated with clinical symptoms of periodontal disease in Japanese high school students. **J. Periodontol.**, v. 75, n. 8, p. 1084- 1089, 2004.

SUZUKI, N. et al. Quantitative microbiological study of subgingival plaque by real-time PCR shows correlation between levels of *Tannerella forsythensis* and *Fusobacterium* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 5, p. 2255-2257, 2004.

TAKEUCHI, Y. et al. *Treponema socranskii*, *Treponema denticola*, and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. **J. Periodontol.**, v. 72, n. 10, p. 1354-1363, 2001.

TAMURA, K. et al. Distribution of 10 periodontal bacteria in saliva samples from Japanese children and their mothers. **Arch. Oral Biol.**, v. 51, n. 5, p. 371-377, 2006.

TANKKUNNASOMBUT, S. et al. Early colonization of mutans streptococci in 2- to 36-month old Thai children. **Pediatr. Dent.**, v. 31, n. 1, p. 47- 51, 2009.

TANNER, A. C. R. et al. Clinical characteristics and microbiota of progressing slight chronic periodontitis in adults. **J. Clin. Periodontol.**, v. 34, n. 11, p. 917-930, 2007.

TANNER, A. C. R. et al. Similarity of the oral microbiota of pre-school children with that of their caregivers in a population-based study. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 17, n. 6, p. 379-87, 2002.

TANNER, A.C.R. et al. The microbiota of young children from tooth and tongue samples. **J. Dent. Res.**, v.81, n. 1, p. 53-57, 2002.

TEUGHEL, W. et al. Bacteria interfere with *A. actinomycetemcomitans* colonization. **J. Dent. Res.**, v. 86, n. 7, p. 611-617, 2007.

THYLSTRUP, A.; FEJERKOV, O. **Cariologia clínica**. 3. Ed. São Paulo: Ed. Santos, 2001. 421 p.

TONG, K. S. K. et al. Clinical responses to mechanical periodontal treatment in Chinese chronic periodontitis patients with and without *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 11, p. 1582-1588, 2003.

UMEDA, M. et al. The distribution of periodontopathic bacteria among Japanese children and their parents. **J. Periodontal Res.**, v. 39, n. 6, p. 398-404, 2004.

VACHIRAROJPISAN, T. et al. Early childhood caries in children aged 6 – 19 months. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 32, n. 2, p. 133-142, 2004.

VALLE, D.; MODESTO, A.; SOUZA, I. P. R. Hábitos alimentares e prevalência da doença cárie em bebês. **R. B. O.**, v. 58, n. 5, p. 332-335, 2001.

VICENTE, V. A. et al. Relação da prevalência da doença cárie e risco microbiológico. **Cienc. Odontol. Bras.**, v. 11, n. 2, p. 44- 48, 2008.

WALTER, L. R. F.; FERELLE, A.; ISSAO, M. **Odontologia para o bebê: odontopediatria do nascimento aos 3 anos**. São Paulo: Artes Médicas, 1996. 246 p.

WAN, A. K. L. et al. A longitudinal study of *Streptococcus mutans* colonization in infants after tooth eruption. **J. Dent. Res.**, v. 82, n. 7, p. 504-508, 2003.

WATSON, M. R.; BRETZ, W. A.; LOESCHE, W. J. Presence of *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* in children correlated with periodontal disease of their parents. **J. Dent. Res.**, v. 73, n.10, p. 1636- 1640, 1994.

WATSON, M. R. et al. Detection of two anaerobic periodontopathogens in children by means of the BANA and ELISA assays. **J. Dent. Res.**, v. 70, n. 7, p. 1052-1056, 1991.

WEINSTEIN, P. et al. Results of a promising open trial to prevent baby bottle tooth decay: a fluoride varnish study. **ASDC J. Dent. Child.**, v. 61, n. 516, p. 338-341, 1994.

WU, Y. M. et al. Association between infection of different strains of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque and clinical parameters in chronic periodontitis. **J. Zhejiang Univ. Sci. B.**, v. 8, n. 2, p. 121-131, 2007.

XIA, T.; BAUMGARTNER, J. C. Occurrence of *Actinomyces* in infections of endodontic origin. **J. Endod.**, v. 29, n. 9, p. 549-552, 2003.

XIMENEZ-FYVIE, L. A. et al. Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. **J. Periodontol.**, v. 77, n. 3, p. 460-471, 2006.

YAMAURA, M. et al. Quantification and detection of bacteria from postoperative maxillary cyst by polymerase chain reaction. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 20, n. 6, p. 333-338, 2005.

YANG, E. Y. et al. Periodontal pathogen detection in gingival/ tooth and tongue flora samples from 18- to 48- month- old children and periodontal status of their mothers. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 17, n. 1, p. 55- 59, 2002.

YANG, H. N. et al. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 113, n. 1, p. 28-33, 2005.

YILDIRIN, S.; YAPAR, M.; KUBAR, A. Detection and quantification of herpesviruses in Kostmann syndrome periodontitis using real-time polymerase chain reaction: a case report. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 21, n. 2, p. 73- 78, 2006.

YIP, H. K; GUO, J.; WONG, W. H. Incipient caries lesions on cementum by mono- and co-culture oral bacteria. **J. Dent.**, v. 35, n. 5, p. 377-382, 2007.

YOKOYAMA, M. et al. Relationship between *Campylobacter rectus* and periodontal status during pregnancy. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 23, n. 1, p. 55-59, 2008.

YOSHIDA, A. et al. Development of a 5' nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 9, p. 4438-4441, 2003.

ANEXOS
ANEXO A



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-

OF. 158/2006
CEP
SFCD/bri

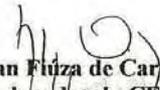
Araçatuba, 19 de setembro de 2006.

Referência Processo FOA 2006-01470

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável do relator que analisou o projeto "AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA BUCAL DE BEBÊS AOS 6, 18 E 30 MESES DE IDADE E SUA RELAÇÃO COM DIETA ALIMENTAR, CONDIÇÃO GENGIVAL, ERUPÇÃO DENTÁRIA E PREVALÊNCIA DE CÁRIE DENTÁRIA" expede o seguinte parecer:

Aprovado:

Informamos a Vossa Senhoria que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, deverá ser enviado relatórios parciais em 14/09/2007, 14/09/2008 e o relatório final em 14/09/2009.


Prof. Dr. Stefan Fuza de Carvalho Dekon
Coordenador do CEP

Ilmo. Senhor
Dr. ROBSON FREDERICO CUNHA
Araçatuba-SP-

Ciente.De acordo.

19/09/06


Dr. Robson Frederico Cunha

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária –
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba – SP
Tel (18) 620-3203 E-mail: diretor@foa.unesp.br

ANEXO B

Condição bucal das crianças aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade:

Pc	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
		51,52,61,62,71,72,81,82 e 74 DEE e outros		
1	edêntulo ausentes	51,52,61,62,71,72,81,82 e 74 DEE e outros	51,52,61,62,71,72,81,82 e 74 hígidos, 53, 54, 63, 64, 83, 84 e 73 DEE e outros ausentes	mudou-se para MG
2	edêntulo ausentes	51,52,61,62,71,72,81,82 Hígidos e outros	51,52,61,62,71,72,81,82,84,74 Hígidos e 53,63,73,83,54 e 64 DEE e outros ausentes	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,81,82 e 83 hígidos porém com pigmentação escuro-esverdeada na cervical
3	edêntulo DEE e outros ausentes	51,52,61,62,71,72,81 e 82 hígidos, 53, 54, 63, 64, 73, 74, 83 e 84	51,52,61,62,71,72,81 e 82 DEE e outros	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83, 84 hígidos
4	edêntulo ausentes	51,52,61,62,71,72,81 e 82 DEE e outros	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83, 84 hígidos e 55,65,75 e 85 DEE	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83, 84 hígidos e 55,65,75 e 85 DEE
5	edêntulo ausentes	51,52,61,62,71,72,81 e 82 DEE e outros	51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 74 e 84 hígidos;	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83, 84 hígidos e 55,65,75 e 85 DEE
6	edêntulo ausentes	81 DEE e outros	51, 61, 71 e 81 hígidos, 54, 64, 74 e 84 DEE e outros ausentes	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83 e 84 hígidos
7	edêntulo ausentes	71 E 81 DEE e outros	outros ausentes	53,63,73 e 83 DEE
8	edêntulo ausentes		61 DEE, 71 e 81 hígidos e outros ausentes	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83 e 84 hígidos
9	edêntulo ausentes	51,52,61,71,81 DEE e outros ausentes	51,61,52,62 CESC (V), 71, 81, 71, 82, 54,64,74 e 84 h'ígidos	51 e 61- CESC (V), 52 e 62 - CECC (MV), 53,63,71,72,73,81,82 e 83 hígidos, 54,64,74 e 84 DEE
10	edêntulo ausentes	51, 61, 71, 81, 52, 62, 72 e 82 hígidos, 53, 63, 73, 54, 64, 74, e 84	51, 52, 61, 62, 71 e 81 hígidos, 54, 64, 74 e 84 DEE e outros ausentes	51 (escurecido por trauma),52,61,62,71,72,81,82 e 54,64,74 e 84 DEE
11	edêntulo DEE	71,72,81,82 DEE e outros ausentes	DEE e outros ausentes	todos presentes hígidos
12	edêntulo outros ausentes			
13	edêntulo outros ausentes			
14	edêntulo ausentes	51,61,71,81 DEE e outros ausentes	51, 61, 71,81 hígidos, 52, 62, 72, 82, 54, 64, 74 e 84 DEE e outros ausentes mancha branca e 51	51,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,75,81,82,83, 85 hígidos e 84 CECC (O)
15	edêntulo outros ausentes	51,52,61,71,72,81,82, DEE e outros ausentes	51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 54, 64, 74 e 84 hígidos; 53, 63, 73 e 83 DEE	todos presentes
16	edêntulo DEE e outros ausentes		51,52,54,61,62,64,71,72,74, 81,82 e 84 hígidos	todos presentes hígidos
17	edêntulo 71,81 DEE e outros		71,81, 52, 51 e 61 hígidos e outros ausentes	51,61,52,62,71,72,81,82 hígidos e

	ausentes		53,54,63,64,73,74 DEE
	51,52,61,62,71,81		
18	edêntulo DEE e outros ausentes	51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82 hígidos; 74 e 84 DEE	
	51, 52, 61, 62, 71, 72,	51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 54, 64, 74 e 84	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83,
19	edêntulo 81, 82 hígidos	hígidos; 53, 63, 73 e 83 DEE	84 hígidos
	51, 52, 61, 62, 71, 72,	51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 54, 64, 74 e 84	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83,
20	edêntulo 81 e 82 hígidos	hígidos; 53, 63, 73 e 83 DEE	84 hígidos
	51, 61, 71 e 81 hígidos,		51,52,61,62,71,72,81,82 hígidos e
21	edêntulo 52 e 62 D	51, 52, 61,62, 71 e 81 hígido	53.54.63.64.73.74.83.84 DEE
	51,61,71,81 DEE e	51,61,71,81, 52,62,72,82,54,64,74 e 84 hígidos	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83,
22	edêntulo outros ausentes	e outros ausentes	84 hígidos
		51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 54, 64, 74 e 84	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83,
23	edêntulo 51,52,61,71,81,82	hígidos; 53, 63 DEE	84 hígidos
	51, 61, 71 e 81 hígidos,		
	52, 62, 72, 82, 64 e 74	51, 61, 71 ,81, 52, 62, 72, 82, 54,64,84 e 74	
24	edêntulo DEE e outros ausentes	hígidos e outros ausentes	todos presentes
	51, 52, 61, 62, 71, 72,	51, 52, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 54, 64, 74 e 84	
25	edêntulo 81 e 82 DEE	hígidos, 53, 63, 73 e 83 DEE	todos presentes
	51,61,71 e 81 DEE e	51,61,71,81,52,62,72 e 82 hígidos, 54,64,74 e	
26	edêntulo outros ausentes	84 DEE e outros ausentes	todos presentes
	51,61,71,81 Hígido e	51,61,71,81,52,62,72 e 82 Hígidos, 54,64,74 e	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83,
27	edêntulo os outros ausentes	84 DEE e os outros ausentes	84 hígidos
	51, 61, 71 e 81 hígidos		
	e 52 e 62 DEE, os		
28	edentulo outros ausentes		
	51, 61, 71 e 81 hígidos,	51, 61,71, 81, 52, 62, 72 e 82 hígidos, 54, 64,	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83,
30	edêntulo 52 e 62 DEE	74 e 84 DEE	84 hígidos
	51,61,71,81 DEE e	51,61,71,81, 52, 62, 72, 82, 54, 64, 74 e 84	
31	edêntulo outros ausentes	hígidos e outros ausentes	todos hígidos
	51,52,61,71,81,62,72,8		
	2 DEE e outros		
32	edêntulo ausentes		
	51,61,71,81 DEE e	51,52,61,62,71,72,81,82 54, 64, 74 e 84	
34	edentulo outros ausentes	hígidos, 53, 63, 73 e 83 DEE e outros ausentes	todos hígidos
	71 e 81 hígidos, 51, 61	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83,
36	edentulo e 62 DEE	e 84 hígidos e outros ausentes	84 hígidos
	71 e 81 DEE, os outros		
37	edentulo ausentes	51,61,62,71,81 hígidos e outros ausentes	todos hígidos
	51, 52, 61, 62, 71, 72,		
	81 e 82 hígidos, os	52,54,61,62,64,71,72,74,81,82 e 84 hígidos e	
38	edentulo outros ausentes	outros ausentes	todos hígidos com exceção do 51 CESC (V)
	51, 61, 71, 81 e 82		
	hígidos, os outros	51,52,61,62,71,72,81,82 hígidos, 54,64,74 e	51,52,61,62,71,72,81,82 hígidos e
39	edentulo ausentes	84 DEE e outros ausentes	53,54,63,64,73,74,83,84 DEE
	51 e 61 DEE, 71 e 81	51,61, 71, 81, 52, 62, 72, 82, 54, 64, 74 e 84	
40	edentulo hígidos	hígidos	mudou-se para Limeira
	51, 61, 71, 81, e 52		51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83,
41	edentulo hígidos	51,52,61,62,71,72,81,82 h'ígidos	84 hígidos
	51, 61, 71 e 81 hígidos		
43	edentulo e 52 DEE		

44	edentulo	51, 52, 61, 62, 71, 72, 81 e 82 hígidos 51, 52, 61, 62, 71 e 81 hígidos e outros	51, 52, 61, 62, 71, 72, 81,82, 54,64,74 e 84 hígidos	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83, 84 hígidos
45	edentulo	ausentes 71 e 81 hígidos, os	51, 52, 61, 62, 71, 72, 81,82, 54,64,74 e 84 hígidos	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83, 84 hígidos
46	edentulo	outros ausentes 51, 52, 61, 62, 71 e 81 DEE, os outros	51, 52, 61, 62, 71, 72, 81,82, 54,64,74 e 84 hígidos	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83, 84 hígidos
47	edentulo	ausentes	51, 61, 71 ,81, 52, 62, 72, 82, hígidos e outros	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83, 84 hígidos
48	edentulo	71 e 81 DEE	ausentes	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83, 84 hígidos
50	edentulo	51,61,71,81,DEE	51,52,61,62,71,72,81,82 hígidos	51,52,53,54,61,62,63,64,71,72,73,74,81,82,83, 84 hígidos

ANEXO C

Padrão de consumo de alimentos açucarados dos pacientes avaliados aos 12, 18 e 24 meses de idade:

PACIENTE	Pontos	classificação	Pontos	classificação	Pontos	classificação
	12 meses		18 meses		24 meses	
1	21	moderado	16	moderado	17	moderado
2	22	moderado	18	moderado	20	moderado
3	14	moderado	16	moderado	16	moderado
4	23	moderado	20	moderado	24	moderado
5	14	moderado	24	moderado	27	moderado
6	20	moderado	20	moderado	22	moderado
7	14	moderado	18	moderado	20	moderado
8	20	moderado	18	moderado	20	moderado
9	22	moderado	30	alto	30	alto
10	20	moderado	22	moderado	22	moderado
11	15	moderado	24	moderado	29	moderado
12	20	moderado	20	moderado	20	moderado
14	22	moderado	30	alto	30	alto
15	18	moderado	15	moderado	20	moderado
16	18	moderado	22	moderado	22	moderado
17	18	moderado	18	moderado	28	moderado
18	11	moderado	14	moderado	16	moderado
19	14	moderado	20	moderado	22	moderado
20	14	moderado	20	moderado	22	moderado
21	14	moderado	14	moderado	18	moderado
22	18	moderado	20	moderado	20	moderado
23	20	moderado	21	moderado	23	moderado
24	20	moderado	17	moderado	17	moderado
25	21	moderado	18	moderado	19	moderado
26	18	moderado	22	moderado	20	moderado
27	22	moderado	28	moderado	29	moderado
28	20	moderado	22	moderado	23	moderado
30	18	moderado	22	moderado	29	moderado
31	15	moderado	20	moderado	22	moderado
32	18	moderado	18	moderado	18	moderado
34	14	moderado	16	moderado	20	moderado
36	22	moderado	20	moderado	22	moderado

37	18	moderado	22	moderado	23	moderado
38	22	moderado	26	moderado	29	moderado
39	18	moderado	20	moderado	22	moderado
40	16	moderado	16	moderado	21	moderado
41	18	moderado	18	moderado	22	moderado
42	13	moderado	15	moderado	25	moderado
43	20	moderado	22	moderado	23	moderado
44	18	moderado	18	moderado	20	moderado
45	16	moderado	18	moderado	22	moderado
46	18	moderado	20	moderado	22	moderado
47	15	moderado	15	moderado	17	moderado
48	12	moderado	19	moderado	19	moderado
50	18	moderado	23	moderado	21	moderado