



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

JORGIANA SANGALLI

DESENVOLVIMENTO DA MICROBIOTA ORAL DE BEBÊS:
análise longitudinal por pirosequenciamento da microbiota de
bebês e suas mães dentro de um Programa de Saúde Bucal
para Primeira Infância

2014

JORGIANA SANGALLI

DESENVOLVIMENTO DA MICROBIOTA ORAL DE BEBÊS: análise longitudinal por pirosequenciamento da microbiota de bebês e suas mães dentro de um Programa de Saúde Bucal para Primeira Infância

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito
Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti

São José dos Campos

2014

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2014.

Sangalli, Jorgiana

Desenvolvimento da microbiota oral de bebês: análise
longitudinal por pirosequenciamento da microbiota de bebês e
suas mães dentro de um Programa de Saúde Bucal para Primeira
Infância. / Jorgiana Sangalli. - São José dos Campos : [s.n.],
2014.

166 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São
José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2014.

Orientador: Cristiane Yumi Koga-Ito

Co-orientador: Fernanda Lourenção Brighenti.

1. Microbiologia. 2. Sequenciamento de Nucleotídeos em
Larga Escala. 3. Saliva. 4. Placa dental. I. Koga-Ito,
Cristiane Yumi, orient. II. Brighenti, Fernanda Lourenção, co-
orient. III. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. IV. Universidade
Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. V. UNESP - Univ
Estadual Paulista. VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 23 de julho de 2014

E-mail: jorgianasangalli@hotmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Adj. Janete Dias Almeida

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Ana Cláudia Okamoto

Faculdade de Odontologia de Araçatuba
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de Araçatuba

Profa. Assoc. Elizabete Brasil dos Santos

Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG
Campus de Ponta Grossa

Profa. Adj. Rebeca Di Nicolo

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 23 de julho 2014.

DEDICATÓRIA

À **DEUS**, por estar sempre comigo me dando forças e iluminando meu caminho e minhas conquistas.

Aos meus pais, **JORGE SANGALLI E BERNARDETE SALTON SANGALLI** pelo amor e dedicação durante toda minha vida, sem vocês nada teria sentido. Não há palavras suficientes para agradecer por tudo que já fizeram por mim e nossa família, minha eterna gratidão e amor.

Ao meu irmão **JORGE AUGUSTO SANGALLI** pelo carinho, amor, amizade e alegrias.

Ao meu eterno namorado **FÁBIO NAHAS PEREIRA DOS SANTOS**, pela atenção, paciência, dedicação e apoio incondicional.

AMO VOCÊS.

AGRADECIMENTOS

À *Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”*, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli e do vice-diretor Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara.

À *CAPES* pela concessão de bolsa e estágio de Doutorado Sanduíche em Leeds – Inglaterra.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)* pela concessão de bolsa e auxílio financeiro ao projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Juliana Campos Junqueira pelos ensinamentos transmitidos.

À Profa. Cristiane Yumi Koga Ito, minha admirável orientadora e amiga, por ter me aberto as portas para o

Doutorado, sempre muito paciente e dividindo sempre seu conhecimento. Muito obrigada pelos momentos de luz e alegrias, por tudo que aprendi e a confiança em mim depositada.

À Profa. Fernanda Lourenção Brighenti, pela co-orientação, atenção e grande amizade.

À Profa. Mônica Fernandes Gomes e Profa. Maria das Graças Vilela Goulart pelas portas abertas para o conhecimento.

Ao Prof. Francisco Nóbrega pela atenção e disponibilidade no Laboratório de Genoma.

À Profa. Thuy Do e David Beighton pela disponibilidade e aprendizado durante o período sanduíche de Doutorado em Leeds – Inglaterra.

Ao querido Prof. Robson Frederico Cunha pela confiança, atenção, colaboração e amizade. E também aos amigos da FOA/UNESP.

Ao amigo Prof. Elerson Gaetti Jardim Jr. pelo grande incentivo na área de Microbiologia.

Ao Prof. Ivan Balducci e ao bioinformata Renato David Puga pela valiosa colaboração nas análises estatísticas e computacionais.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, Rosemary De Fátima Salgado, Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka, Erena Michie Hasegawa e Ivan Oliveira Damasceno, meu reconhecimento pelo desenvolvimento de seus trabalhos e preocupação em todas as atividades, a ajuda de vocês foi essencial.

Ao Carlos Guedes, pela grande colaboração referente ao Processo FAPESP.

Aos funcionários da ICT/UNESP, que sempre ajudaram a superar os obstáculos do cotidiano.

Às minhas amigas Aline Chiodi Borges e Maria Alcionéia Carvalho, pela amizade verdadeira, pelos sorrisos, conversas e alegrias. Com vocês tudo foi mais fácil nessa caminhada.

Aos amigos Guilherme Teodoro, Daniel Freitas e Bruno Mello de Matos, pela amizade e por toda alegria e conhecimento.

À minha amiga Natália Pola por todo carinho e atenção, amizade, paciência e incentivo durante todos esses anos.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação, pelos bons momentos, conversas e aprendizados.

Ao meu sogro Luiz Álvaro Pereira dos Santos e sogra Márcia Nahas Pereira dos Santos por toda atenção e carinho ao longo dessa jornada. Vocês foram muito importantes para mais esta conquista.

À TODOS, MEU MUITO OBRIGADA.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Estabelecimento da microbiota bucal do bebê	19
2.2 Pirosequenciamento	31
3 PROPOSIÇÃO	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos	39
4.2 População Alvo	39
4.3 Caracterização do estudo	40
4.4 Seleção de pacientes e coleta de dados clínicos	40
4.4.1 Seleção de pacientes e protocolo preventivo adotado.....	40
4.4.2 Avaliação Clínica e anamnese.....	42
4.4.3 Avaliação da dieta e higiene bucal.....	44
4.5 Análise longitudinal da microbiota bucal de bebês e suas respectivas mães por pirosequenciamento	45
4.5.1 Coleta da amostra de saliva.....	45
4.5.2 Coleta da amostra de biofilme dentário.....	45
4.6 Análise das amostras por pirosequenciamento	46
4.6.1 Extração do DNA e Quantificação.....	49

4.6.2 Amplificação do gene 16S rRNA (PCR)	51
4.6.3 Purificação das amostras.....	53
4.6.4 Montagem dos pools.....	54
4.7 Análise dos resultados.....	55
5 RESULTADOS.....	57
6 DISCUSSÃO.....	114
7 CONCLUSÃO.....	125
8 REFERÊNCIAS.....	126
APÊNDICES.....	135
ANEXOS.....	166

Sangalli J. Desenvolvimento da microbiota oral de bebês: análise longitudinal por pirosequenciamento da microbiota de bebês e suas mães dentro de um Programa de Saúde Bucal para Primeira Infância [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

RESUMO

O estudo da microbiota bucal de bebês e como ela se altera com o tempo é de grande importância para a prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças bucais num estágio precoce. O objetivo desse estudo foi avaliar longitudinalmente, nos períodos de 6, 12, 18 e 24 meses de idade, o microbioma oral de bebês saudáveis e suas respectivas mães por análise de pirosequenciamento. Setenta e quatro pares de mães e bebês acompanhados em um programa de saúde bucal foram incluídos no estudo. Um total de cinquenta e oito participaram em todo o período experimental. A população de bebês foi acompanhada durante todo o período, recebendo orientações e procedimentos previstos no protocolo do programa. Dados sobre dieta, higiene bucal, presença de dentes, prevalência de cárie e condições periodontais de bebês e suas respectivas mães foram coletados. Para a análise de pirosequenciamento, foram selecionados 5 pares de bebês e mães seguindo rigorosos critérios de inclusão para obtenção de amostra homogênea de bebês que se mantiveram sem a ocorrência de doenças bucais durante todo o período de avaliação. Também foram analisadas amostras do único bebê que desenvolveu cárie ao longo do estudo. Foram coletadas amostras de saliva e biofilme dentário do bebê e suas respectivas mães para análise da diversidade microbiana por pirosequenciamento 454 dos produtos de PCR do gene 16S ribossomal. A eficácia do programa de promoção de saúde bucal para este estudo foi reiterada com a ocorrência de cárie em apenas 1 dos bebês (1,51%) acompanhados durante 24 meses. A diversidade microbiana da saliva e biofilme dentário dos bebês manteve-se estável em relação ao número de Filos ao longo dos períodos. Observou-se aumento considerável de gêneros na saliva dos bebês dos 6 meses aos 12 meses de idade do bebê, sendo que esta distribuição se manteve nos demais períodos. Aos 12 meses, 77 diferentes gêneros faziam parte do microbioma do biofilme dentário do bebê, sendo este número maior quando comparado à saliva. Observou-se grande similaridade entre os gêneros predominantes na microbiota salivar e do biofilme das mães e bebês. Um grande número de

filotipos bacterianos foi compartilhado por crianças saudáveis e suas mães. Não foi observado perfil específico para doença cárie no microbioma do bebê com cárie quando sobreposto ao dos bebês cáries-free.

Palavras-chave: Microbiologia. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala. Saliva. Placa dental.

Sangalli J. *Development of oral microflora of infants: longitudinal analysis of babies followed in an Oral Health Program for Early Childhood and their mothers' microflora by pyrosequencing [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.*

ABSTRACT

Data on infants' oral microflora and how it changes in time is of utmost importance for the prevention, diagnosis and treatment of oral diseases in early stages. The goal of this study was evaluate, longitudinally, in the periods of 6, 12, 18 and 24 months of age, the oral microbiome of healthy babies and their mothers by pyrosequencing analysis. Seventy-four pairs of mothers/babies followed in a Program of Oral Healthy were included in the study. A total of fifty-eight participated in all the experimental period. The population of babies was followed during all the period, receiving orientation on oral health and procedures foreseen in the protocol of the referred program. Data on diet, oral hygiene, presence of teeth, prevalence of caries, and periodontal conditions of babies and their mothers were collected. For pyrosequencing analysis, 5 pairs of babies and mothers were selected following rigorous criteria of inclusion, in order to obtain a homogeneous sample of babies who did not develop caries during all the evaluation period. Also, samples from of the only baby who developed caries along the study were analyzed. Samples of saliva and dental biofilm from the babies and mothers were analyzed for the microbial diversity by pyrosequencing 454 of products of PCR of 16S ribosomal gene. The effectiveness of the Oral Health Program in this study was confirmed with the occurrence of caries in only 1 of the babies (1.51%) followed during 24 months. Salivary and biofilm microbial diversities of babies were stable in relation to the number of Phyla during the evaluation periods. A considerable increasing in the number of genus in babies' saliva was observed in the period of 6 to 12 months of age. After this period, the distribution was stable. At the age of 12 months, 77 different genus were found in the microbioma of infants' dental biofilm and this value was higher when compared to saliva. High similarity between the relevant genus in babies and mothers saliva and biofilm was observed. Elevated number of bacterial photypes was shared by healthy children and their mothers. No specific profile for caries was found in the microbioma of the baby with caries in relation to caries free.

Keywords: Microbiology. High-Throughput Nucleotide Sequencing. Saliva. Dental Plaque.

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral e tecidos adjacentes representam o mais complexo e diverso microbioma do corpo humano em contato com o ambiente externo. Nessa área, diversas comunidades microbianas são encontradas na superfície dentária, sulco gengival e mucosas (Samaranayake, 2006).

A cárie é uma doença multifatorial de origem infecciosa e que ainda constitui um dos maiores desafios da Odontologia (ten Cate, 2009).

O papel das bactérias na patogênese da cárie dentária foi demonstrado quando McClure e Hewitt (1946) observaram que ratos alimentados com dieta cariogênica tratados com penicilina tinham o desenvolvimento de cárie reduzido e quando ratos *germ free* foram alimentados com dieta cariogênica não desenvolviam lesões cariosas (Orland et al., 1954).

Durante muitos anos, pesquisadores tentaram demonstrar que somente poucas espécies específicas estavam ativamente envolvidas na etiologia da cárie dentária (Loesche, 1992). A responsabilidade pela iniciação e progressão da cárie foi atribuída, respectivamente a *Streptococcus mutans* e a *Lactobacillus acidophilus*, devido a suas propriedades acidogênicas e acidúricas (Bunting et al., 1929; Loesche, 1986). Entretanto, a cárie dentária parece poder ocorrer mesmo na ausência desses patógenos. Aas et al. (2008) demonstraram que cerca de 10% dos pacientes com cárie rampante não têm níveis detectáveis de *S. mutans*. Assim, outras bactérias podem ser capazes de produzir ácidos a partir de carboidratos fermentáveis, o que está de acordo com a hipótese da placa ecológica. Essa hipótese foi proposta por

Marsh (1994) e sugere que uma mudança nas condições ambientais desencadeia uma mudança na microflora, o que pode predispor a ocorrência da doença.

Deste modo, a diversidade da microflora bucal humana pode ser subestimada (Keijser et al., 2008). Aas et al. (2008) demonstraram que quase metade das bactérias isoladas de lesões cariosas ainda precisa ser identificada. O sequenciamento do RNA ribossomal revelou incontáveis bactérias que ainda precisam ser descobertas. Paster et al. (2001) demonstraram que quase 40% das espécies precisam ser caracterizadas.

A metodologia mais recentemente utilizada e que permite análises em larga-escala da diversidade microbiana é o pirosequenciamento. Pirosequenciamento é um método de sequenciamento baseado no monitoramento em tempo real da síntese de DNA que é detectada por bioluminescência (Ronaghi et al., 1998; Ahmadian et al., 2006). É considerada uma técnica precisa, flexível e facilmente automatizada (Langae, Ronaghi, 2005). O pirosequenciamento tem sido utilizado com diferentes finalidades, como determinação de estruturas de DNA secundário, detecção e análise de mutações, DNA cíclico, genes associados a doenças, polimorfismos e para genotipagem microbiana (Ahmadian et al., 2000; Garcia et al., 2000; Nordström et al., 2000; Ronaghi et al., 1998, Ronaghi, Elahi, 2002).

A tipagem microbiana geralmente envolve o sequenciamento da região 16S do RNA ribossomal, que contém regiões altamente conservadas e sequências específicas para espécies (McCabe et al., 1995). Diversos estudos demonstraram o valor do pirosequenciamento para verificar diversidade bacteriana em diferentes ambientes, como sistema de água industrial (Jonasson et al., 2002), oceano (Huber et al., 2007), solo (Roesch et al., 2007), vagina (Sundquist et al., 2007) e feridas crônicas (Dowd et al., 2008).

Na cavidade bucal, Keijser et al. (2008) analisaram a saliva e o biofilme supragengival de adultos saudáveis. Os autores encontraram aproximadamente 19.000 filotipos, um número significativamente maior que o relatado na literatura. Zaura et al. (2009) encontraram diferentes perfis de colonização quando comparados diferentes sítios de amostragem (língua, bochecha, palato e superfície dentária). A diversidade encontrada também foi maior que a diversidade previamente descrita em estudos que utilizaram os métodos convencionais (Aas et al., 2005; Nasidze et al., 2009). Cephas et al. (2011) avaliaram o microbioma da saliva de crianças edêntulas e sua respectiva mãe ou cuidadora e observaram uma rica comunidade bacteriana mesmo antes da erupção dentária. Belda-Ferre et al. (2012) analisaram a cavidade oral humana sob as condições de saúde e doença. Estes dados mostraram que as cavidades com cárie não são dominadas apenas por *S. mutans* (a espécie originalmente identificada como o agente etiológico da cárie dentária), e sim por uma comunidade complexa formada por dezenas de espécies de bactérias, de acordo com a visão de que a cárie é uma doença polimicrobiana.

A microbiota da cavidade bucal em condições saudáveis é diferente daquela associada à doença (Aas et al., 2005; Corby et al., 2005). Estudos disponíveis utilizaram diferentes técnicas, diferentes sítios da cavidade bucal, diferentes condições orais e diferentes faixas etárias para avaliar a diversidade microbiana na cavidade bucal: Chhour et al. (2005) verificaram dentina cariada em adultos; Li et al. (2007) exploraram crianças livres de cárie e crianças com cárie precoce da infância severa; Aas et al. (2008) analisaram amostras de diferentes condições bucais (lesões de mancha branca, de dentina e de dentina profunda) em voluntários de 2 a 21 anos e compararam com a de adultos saudáveis; Ling et al. (2013) avaliaram 10 jovens adultos entre 22 e 24 anos e 10 crianças entre 3 e 6 anos de idade com o objetivo de obter as características da microbiota de pacientes saudáveis; Xu et al. (2014),

analisaram crianças antes da erupção dos segundos molares decíduos e verificaram que alguns gêneros, como *Neisseria* e *Prevotella* estavam presentes nos grupos com cáries e sem cáries. *Streptococcus* e *Veillonella* estiveram presentes em crianças com cáries.

A Associação Americana de Odontopediatria (1994) sugere que os cuidados dentários devam começar antes do primeiro ano de vida. O estabelecimento de hábitos saudáveis precocemente na vida da criança é melhor do que lutar para corrigi-los posteriormente. Assim, um programa de saúde bucal para bebês foi criado na Bebê-Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP com o objetivo de educar pais com relação à importância do cuidado preventivo e para instituir bons hábitos dietéticos e de higiene.

Um protocolo preventivo foi proposto por Cunha et al. (2000). O primeiro passo para participar desse programa é assistir a uma palestra em que são explicados os principais problemas que os pais podem encontrar nos seus filhos e como preveni-los. O segundo passo é a primeira consulta odontológica, quando é obtido um histórico completo da saúde da família e é realizado um exame bucal completo nos bebês. Os parentes recebem instruções de como realizar a higiene bucal dos bebês e sobre hábitos dietéticos. O acompanhamento é ajustado de acordo com o risco de cárie avaliado. Se o risco a cárie é pequeno, o acompanhamento ocorre a cada dois meses (Cunha et al., 2000).

Definir a microbiota bucal de bebês e como ela se altera com o tempo seria de grande importância para uma melhor compreensão de como a microbiota bucal se desenvolve e para ajudar na prevenção, no diagnóstico e no tratamento de doenças bucais num estágio precoce. Esse estudo é inovador, pois combina o Programa de Saúde Bucal para Primeira Infância com monitoramento longitudinal do desenvolvimento da microbiota oral de bebês saudáveis e suas respectivas mães. Não foram detectados estudos longitudinais anteriores da microbiota bucal de bebês

usando a metodologia do pirosequenciamento (do nascimento até os 24 meses de idade).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estabelecimento da microbiota bucal do bebê

Caufield et al. (1993) avaliaram longitudinalmente 46 pares de mães e seus filhos, residentes em uma área urbana, desde o nascimento e entre 3 e 6 anos de idade para o estudo da aquisição de estreptococos do grupo mutans. Os autores observaram utilizando o método de cultura, que a aquisição inicial de estreptococos do grupo mutans por 82,6% das crianças da amostra de seu estudo (38/46) ocorreu em um período delimitado denominado “janela de infectividade” entre os 19° e 31° meses de vida (26° de vida em média). Este período apresentou coincidência com a erupção dos molares decíduos, cujas superfícies oclusais retentivas favorecem a colonização por estes microrganismos.

Roeters et al. (1995) avaliaram a aquisição de *Streptococcus mutans* e lactobacilos em 252 crianças de 2 a 5 anos de idade, correlacionando a ocorrência destes microrganismos e 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 biofilme dentário, 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 no biofilme 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 biofilme foram altamente significantes.

Li e Caufield (1995) avaliaram o genótipo de estreptococos do grupo mutans em 34 pares de mães e filhos no período de aquisição inicial. As bactérias orais de mães e filhos foram monitoradas do nascimento da criança até os 3 anos de idade, em intervalos de 3 meses. Os genótipos das bactérias do recém-nascido foram idênticos em 71% dos 34 pares de mães e filhos estudados, com uma maior fidelidade para o sexo feminino quando comparado ao masculino (88% vs 53%). Em nenhum caso houve homologia de genótipos entre bebês e pais, comprovando que linhagens de estreptococos do grupo mutans seguem uma linha materna. Embora a prevalência de cárie dentária fosse baixa nesta população de crianças jovens (11/34, 32%), observou-se que crianças do sexo masculino que abrigavam o mesmo genótipo das mães tinham uma probabilidade 13 vezes maior de ter cárie do que crianças do sexo feminino que adquiriram estirpe de suas mães. De acordo com os autores, esses achados apontam para a continuação dos estudos para delinear mais a inter-relação entre gênero, raça, e os resultados da cárie em função da fidelidade da transferência de estreptococos do grupo mutans das mães para seus bebês.

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 para cultivo microbiano. Os resultados evidenciaram que as mães 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.

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.

Fraiz e Walter (2001) avaliaram os fatores associados com o desenvolvimento da cárie dentária em 200 crianças pré-escolares entre 24 e 48 meses que recebiam cuidado odontológico regular e acompanhamento na clínica do bebê da Universidade Estadual de Londrina, bem como suas mães. Foram realizadas avaliações clínicas e aplicação de questionários sobre dieta, higiene oral, questões socioeconômicas e comportamentais. No que diz respeito aos hábitos de higiene bucal, não houve diferença significativa entre os pré-escolares que apresentavam cárie e aqueles que não apresentavam. No entanto, a presença de biofilme dentário visível nos incisivos superiores foi fortemente associada à presença de cárie dentária. Outros fatores associados com a presença de cárie foram a escolaridade do pai ou de ambos os pais igual ou inferior a 8 anos, alto consumo de açúcar e mamadeira durante o sono. Segundo os autores, o padrão dietético continua sendo a principal causa de lesões de cárie. Além disso, a presença de biofilme dentário visível na superfície vestibular dos incisivos superiores deve ser considerada como um importante sinal clínico, frequentemente associado a padrões inadequados de dieta e higiene bucal.

Wan et al. (2001a), utilizando o método de cultura, detectaram a presença de *S. mutans* em edêntulos, tendo sido verificada uma prevalência de colonização de 30% das 188 crianças avaliadas, inicialmente com 3 meses de vida. Buscou-se uma relação entre a colonização por *S. mutans* e a presença de Nódulos de Bohn. A colheita de confirmação realizada 3 meses após a avaliação inicial, demonstrou que apenas as crianças que possuíam o nódulo na cavidade bucal apresentaram resultado positivo nesta avaliação, o que poderia estar relacionado à menor taxa de descamação do tecido mucoso e consequente melhoria da capacidade de aderência do microrganismo.

Utilizando a mesma metodologia, Wan et al. (2001b) correlacionaram a presença de *S. mutans* com a prematuridade ou não de nascimento da criança. Verificaram que 50% das 60 crianças prematuras e 60% das 112 crianças com tempo normal de gestação, examinadas durante a $26,7 \pm 3,8$ semanas de vida, apresentavam-se colonizadas, mesmo na colheita de confirmação 3 meses após a primeira, estando a infecção diretamente relacionada às características maternas tais como pobre higienização, elevada prevalência de doença periodontal e consumo de açúcar, além da amamentação natural da criança, especialmente quando utilizada em livre demanda.

Tedjosasongko e Kozai (2002), buscando determinar a idade de colonização inicial por estreptococos do grupo mutans e a possibilidade de transmissão vertical entre crianças de mesma creche, com intervalos mensais por um período de 30 meses, coletaram amostras de 39 crianças, com idades variando de 0 a 5 anos, inicialmente não colonizadas. Amostras de alguns dos pais e funcionárias da creche foram também obtidas. Verificou-se que a probabilidade da criança ser colonizada por estreptococos do grupo mutans aumenta significativamente entre os 12 e 25 meses de vida, após a erupção dos dentes posteriores. A transmissão entre crianças e/ou fontes não identificadas foi verificada em 58,4% dos casos estudados, enquanto que

entre mãe/filho e entre pai/filho, estes valores foram de 33,3% e 8,3%, respectivamente. Não foi observada similaridade entre cepas isoladas de crianças e atendentes das creches.

Tanner et al. (2002) estudaram a similaridade da microbiota oral de 200 crianças (174 com a presença de dentes e 18 sem a presença de dentes) entre 6-18 meses e 19-36 meses com seus respectivos cuidadores usando uma sonda de DNA. Amostras do dente, da língua e biofilme subgengival foram analisadas. Os microrganismos foram detectados tanto em pré-dentados quanto em dentados e o perfil da microbiota das crianças foi fortemente associada com a microbiota de seus cuidadores.

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 recebia aleitamento materno associado à mamadeira. Com relação à higiene bucal, a maioria 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. Assim, os autores concluíram que a cárie precoce da infância é um problema de saúde pública e que se deve adotar a fluoretação suplementar como medida preventiva além de aumentar os cuidados odontológicos na fase pré-escolar.

Wan et al. (2003) buscaram por meio de acompanhamento longitudinal, monitorar a colonização por *S. mutans* nas crianças de seu estudo anterior (Wan et al., 2001a) após a erupção dentária. Observaram que a prevalência de colonização aumentou com a idade, de modo que aos 24 meses de vida, 84% das crianças albergava

S. mutans em sua cavidade bucal. A idade média de aquisição do microrganismo na população estudada foi de 15,7 meses de vida, apresentando relação com a utilização noturna de bebidas adoçadas, frequência de exposição à sacarose e a contagem microbiana materna. Em contraste, a não colonização mostrou-se relacionada com a frequência de escovação e excessiva utilização de antibióticos.

Klein et al. (2004) avaliaram o perfil de colonização de *S. mutans* e *Streptococcus sobrinus* na cavidade oral de crianças, incluindo o padrão de transmissão vertical de mãe para filho, a diversidade genotípica, e a estabilidade das cepas. Participaram do estudo, 16 pares de mãe-filho, que foram monitorados durante 20 meses. Amostras de saliva, dorso da língua, mucosa, rebordo alveolar e biofilme dental das crianças foram coletados bimestralmente. Amostras de saliva das mães também foram coletadas. Depois do isolamento e identificação o método de PCR (reação de polimerização em cadeia) foi realizado para a caracterização genotípica de *S. mutans* (968 isolados) e *S. sobrinus* (111 isolados). As crianças abrigavam de 1 a 4 genótipos distintos de *S. mutans* e um único genótipo de *S. sobrinus*. Embora a prevalência e a diversidade genotípica de *S. mutans* foram maiores do que as de *S. sobrinus*, a presença de genótipos correspondentes de *S. mutans* e *S. sobrinus* foi semelhante (para 81,25 e 83,33% dos pares mãe-filho, respectivamente), sugerindo a transmissão vertical para ambas as espécies. Este estudo longitudinal mostrou um aumento na diversidade genotípica de *S. mutans* na cavidade oral durante o período de acompanhamento. Segundo os autores os genótipos de *S. mutans* e *S. sobrinus* adquiridos das mães ou fontes alternativas podem apresentar persistência na cavidade oral e/ou detecção transitória, refletindo o contínuo desenvolvimento da microbiota oral em crianças.

Lindquist e Emilson (2004) determinaram a aquisição inicial de *S. mutans* e *S. sobrinus* em crianças cujas mães apresentavam ambas as espécies. 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 biofilme proveniente de dentes e língua das crianças. 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 foi encontrado nas crianças e nove deles eram idênticos aos das mães. A experiência de cárie foi considerada baixa no período estudado, envolvendo oito crianças.

Li et al. (2005) analisaram fatores variáveis maternos e perinatais para determinar a influência de aquisição inicial de *S. mutans* em bebês. Um total de 218 grávidas no terceiro trimestre de gestação foi avaliado. Após o parto estes pares de mãe-bebê foram acompanhados por 4 anos e houve uma perda de 62 pares durante o estudo. Assim, 156 mães e seus bebês (54,5% sexo masculino e 45,5% do sexo feminino) foram incluídos no estudo. Amostras de saliva e biofilme dental da mãe foram coletadas em cada visita e também uma amostra de cada bebê que foram então cultivadas e identificadas. Segundo os autores, houve uma associação positiva entre o parto cesáreo e a aquisição e transmissão inicial de *S. mutans*. Entre as crianças que foram infectadas, aqueles nascidos por cesariana adquiriram *S. mutans* 11,7 meses mais cedo do que bebês de parto normal. O estudo constatou que a idade gestacional, nível de *S. mutans*, escore de cárie, doenças sexualmente transmissíveis (DST), e renda familiar tiveram efeito significativo sobre a aquisição de *S. mutans*. Ainda bebês de cesárea abrigaram um único genótipo de *S. mutans*, que era idêntico ao de suas mães (100% de fidelidade).

Law et al. (2007) revisaram a literatura sobre os fatores-chave envolvidos na colonização oral de bactérias cariogênicas do grupo mutans em crianças e relataram que o grupo mutans consiste principalmente das espécies *S. mutans* e *Streptococcus sobrinus*, comumente cultivados da boca de crianças, com prevalência de infecção de 30% em bebês aos 3 meses para mais de 80% em 24 meses de idade com a dentição decídua. Ainda, estreptococos do grupo mutans são usualmente transmitidos para as crianças através de suas mães, e o risco de transmissão aumenta com os altos níveis destes na saliva da mãe.

Li et al. (2007) avaliaram a diferença da composição microbiana da cavidade oral de crianças com cárie severa da infância e livres de cárie por meio da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturado (DGGE), já que quase metade das bactérias da saliva e placa dental não são cultiváveis. Amostras de biofilme dentário foram coletadas de 20 crianças de 2 a 8 anos. De acordo com os autores, observou-se uma maior e mais diversa população bacteriana nas crianças livres de cárie (n=12) do que nas crianças com cárie severa da infância (n=8). O grupo com cárie severa da infância apresentou um total de 94,5 filotipos e o grupo livre de cárie apresentou 113,4. Estes resultados sugerem que a diversidade e complexidade microbiana da placa dental são significativamente menores em crianças com cárie severa da infância e que a técnica DGGE pode ser utilizada como ferramenta para reconhecer padrões de grupos específicos bacterianos.

Llena e Forner (2008) afirmaram que o consumo de doces 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 doces, pães industrializados e refrigerantes. Segundo os autores, estes aspectos devem ser tidos em conta ao dar aconselhamento dietético para o público e em programas de educação em saúde para as crianças.

Ge et al. (2008) estudaram a colonização de *S. mutans* e *Streptococcus sanguinis* na cavidade oral de 22 crianças hispânicas de baixa renda, destes 11 meninos e 11 meninas, com idades entre 2,5-8,6 anos, e a associação com a cárie precoce e severa da infância. Amostras de saliva e biofilme dentário foram coletadas de 14 crianças com cárie precoce e severa da infância e de 8 crianças livres de cárie. Todas as crianças com cárie precoce e severa da infância foram positivas para *S. mutans*; 100% das crianças livres de cárie e 93% das crianças com cárie precoce e severa da infância foram positivos para *Streptococcus sanguinis*. Os autores concluíram que a interação de *S. sanguinis* com *S. mutans* foi um fator fortemente associado com o status de cárie em crianças, sugerindo que as relações destes dois microrganismos na cavidade bucal desempenham um papel importante no desenvolvimento da cárie.

Gizani et al. (2009) examinaram a distribuição de 20 bactérias cariogênicas em amostras de cinco diferentes habitats bucais (saliva, biofilmes supragengival e subgengival, dorso da língua e tecidos moles) em 93 crianças gregas com idades entre 3 e 12 anos (média \pm dp: $7,9 \pm 2,5$), atendidos na clínica de Pós-Graduação em Odontopediatria da Universidade de Atenas. Participaram do estudo 60,2% do sexo masculino e 39,8% feminino. Além disso, foram examinadas mudanças nos níveis e proporções da microbiota cariogênica com o aumento da idade. As amostras foram avaliadas através de uma modificação da técnica de hibridização DNA-DNA checkerboard. As bactérias cariogênicas estavam presentes em quase todas as crianças saudáveis. Diferenças foram encontradas nas proporções de bactérias que colonizam os diferentes habitats orais amostrados. Tecidos moles, saliva e língua foram mais frequentemente colonizados por espécies de estreptococos cariogênicos quando comparados ao biofilme, portanto, estas superfícies podem servir como reservatórios de patógenos orais e requerem atenção durante intervenções terapêuticas e preventivas. As proporções de *S.*

sobrinus foram maiores do que os de *S. mutans* em todos os habitats. *Streptococcus sanguinis* aumentou com a idade, enquanto *S. mutans* e *S. sobrinus* não mudaram com a idade. Em contraste, *L. acidophilus* diminuiu com a idade.

Seow et al. (2009) avaliaram mudanças longitudinais nas proporções de cinco espécies de estreptococos do grupo mutans comumente encontrados no biofilme oral de crianças, entre elas *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, e *Streptococcus salivarius* e associaram com crianças pré-termo livres de cárie e a termo livres de cárie com idade entre 3 e 24 meses. Amostras de biofilme dentário e saliva foram obtidas de 15 pré-termos e 15 controles a termo nas idades de 3, 6, 18 e 24 meses. A técnica de PCR quantitativo em tempo real foi utilizada para determinar as 5 espécies. Todas as espécies de estreptococos em geral aumentaram na faixa etária de 3 a 24 meses. Não houve diferença significativa nos números de todas as espécies de estreptococos entre crianças pré-termo e de termo em todas as idades entre os investigados.

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 checkerboard, 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 zaragatoas, que foram friccionadas na região 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 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.

Meurman et al. (2010) avaliaram associações entre a colonização precoce de *S. mutans* em crianças jovens e fatores socioeconômicos e hábitos de saúde bucal. Foram selecionadas no estudo 512 crianças com 18 meses positivas para *S. mutans* e também seus responsáveis. Foram aplicados questionários para avaliar a frequência do uso de antibióticos, a alimentação noturna, o uso de produtos açucarados ou bebidas e uso de xilitol pela mãe. De acordo com os autores, a precoce colonização por *S. mutans* foi significativamente associada com a ocupação do responsável e nível socioeconômico do mesmo.

Ling et al. (2010) avaliaram a microbiota oral de 60 crianças entre 3 e 6 anos de idade (34 do sexo masculino e 26 do feminino). Os grupos foram divididos por sexo e pela presença ou ausência de cárie. Amostras de saliva e biofilme foram coletadas e a análise foi realizada pela técnica de PCR-DGGE e pirosequenciamento. Um total de 186.787 sequências de alta qualidade foi obtido para avaliar a diversidade de bactérias e 41.905 sequências únicas representaram todos

os filotipos. A microbiota oral em crianças foi muito mais diversificada do que estudos anteriores relatados. Os filotipos na saliva e biofilme supragengival foram significativamente diferentes e podem ser divididos em dois grupos distintos. Os gêneros de *Streptococcus*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Leptotrichia Granulicatella*, e *Thiomonas* em biofilmes supragengivais foram significativamente associados com cárie dentária. Os resultados mostraram que não há patógeno específico, mas uma população de patógenos com correlação significativa com a cárie dentária. A enorme diversidade da microbiota oral permitiu uma melhor compreensão do ecossistema oral, e assim novo rumo sobre a etiologia da cárie dentária.

Jiang et al. (2011) avaliaram microrganismos do biofilme supragengival, e estreptococos envolvidos em diferentes estágios de cárie. Quarenta e cinco amostras de crianças (idade entre 3 e 5 anos) cárie moderada ($4 \leq \text{CPO-D} \leq 6$), cárie suscetível ($\text{CPO-D} \geq 10$), e livre de cáries foram coletadas. Para a análise foi utilizado a técnica DGGE. Trinta e quatro diferentes espécies de bactérias foram identificadas e classificadas. Estreptococos do grupo mitis e *Campylobacter* spp., os quais estavam presentes em indivíduos saudáveis não estavam presentes em indivíduos suscetíveis à cárie. Ainda, *Capnocytophaga*, *Burkholderia*, e *Prevotella* foram encontrados em níveis significativamente menores no grupo de amostras de indivíduos suscetíveis à cárie. Não houve diferença na presença de *Neisseria*, *Leptotrichia*, *Haemophilus*, estreptococos do grupo mutans, *Corynebacterium* e *Actinomyces* nos 3 grupos. *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus oralis* apresentaram uma prevalência significativamente maior em crianças saudáveis, enquanto que a de *S. mutans* e *Streptococcus sobrinus* não variou entre os três grupos. Em geral, estes resultados sugerem que a microbiota do biofilme supragengival como um todo sofre uma mudança mais complexa no processo de cárie.

Nelun Barfod et al. (2011) investigaram e compararam a microflora oral de salivas de bebês nascidos de parto normal e cesárea pela técnica de hibridização DNA-DNA checkerboard. Oitenta e quatro bebês participaram do estudo: parto normal (n=42) ou cesárea (n=42). Uma alta prevalência de *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus curvata*, *Lactobacillus salivarius*, e *Lactobacillus casei* foi detectado em bebês nascidos de parto normal. Bactérias associadas à cárie como *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* foram detectados em 63% e 59% de todos os bebês de parto normal e cesárea respectivamente. Uma prevalência significativamente maior de certas estirpes relacionadas à saúde foi encontrada em bebês de parto normal em comparação com bebês nascidos por cesárea.

Thakur et al. (2012) avaliaram a correlação entre nascimento de crianças de parto normal ou cesárea e a colonização oral por *S. mutans* e alguns hábitos de alimentação e higiene oral a cada 3 meses até que as crianças completassem 1 ano. Foram avaliados 60 pares de mães e bebês. Os resultados mostraram que o prolongado uso de mamadeira, status socioeconômico e alimentos experimentados pelas mães apresentaram possível aquisição inicial de *S. mutans* na cavidade oral das crianças. Não houve correlação com o tipo de parto para a aquisição de *S. mutans*.

2.2 Pirosequenciamento

O pirosequenciamento foi inicialmente descrito por Ronaghi et al. (1996) ao demonstrar que a molécula de pirofosfato (PPi), produzida durante a reação de polimerização do DNA, poderia ser utilizada para detectar a incorporação de um nucleotídeo específico. Este método foi denominado de “sequenciamento pela síntese”, pois a

sequência é determinada à medida que é sintetizado a fita complementar. Todo processo envolve a participação de 4 enzimas: DNA polimerase, sulfúrilase, luciferase e apirase. Inicialmente a reação de pirosequenciamento é montada contendo o tampão de reação, os *primers*, o DNA molde, o conjunto de enzimas e seus substratos (adenosina 5' fosfosulfato–APS e luciferina). Após adição dos nucleotídeos, e caso seja complementar a fita molde, este é incorporado pela DNA polimerase e gera uma molécula de PPi como subproduto da reação. A reação continua com a ação da enzima sulfúrilase que converte o PPi em ATP (através do substrato APS), e então a enzima luciferase transforma o ATP em sinal luminoso. A intensidade de luz emitida pela reação é detectada por sensores do equipamento.

Segundo Ronaghi e Elahi (2002), a técnica do pirosequenciamento tem capacidade de sequenciar o DNA em tempo real e em larga escala, com leitura rápida, de baixo custo, precisão, facilidade de utilização e alta flexibilidade.

De acordo com Ahmadian et al. (2006), o pirosequenciamento tem sido utilizado em uma ampla gama de aplicações, tais como genotipagem de polimorfismos de um único nucleotídeo, detecção de mutação e identificação genes microbianos. A tecnologia possui características únicas que a tornam vantajosa em comparação com outros métodos de sequenciamento: suas diversas aplicações.

Keijser et al. (2008) avaliaram a riqueza de espécies da microbiota oral da população adulta saudável e determinaram o número de filotipos diferentes e sua abundância relativa na saliva e biofilme supragengival. Foram coletadas amostras de saliva de 71 indivíduos adultos e também amostras de biofilme supragengival de um grupo de 98 indivíduos. As amostras foram sequenciadas pelo pirosequenciador 454 da Life Sciences. As 197.600 sequências geradas renderam aproximadamente 29.000 sequências únicas, representando 22 filós taxonômicos. O agrupamento das sequências operacionais em unidades

taxonômicas produziu 3.621 e 6.888 espécies de filotipos na saliva e biofilme, respectivamente. Segundo os autores, este trabalho dá uma visão radicalmente nova para a diversidade da microflora oral humana, que, com um número estimado de 19.000 filotipos, é consideravelmente maior do que o anteriormente reportado. Assim, esta nova visão torna-se um desafio para os taxonomistas e ecologistas para determinar o impacto dessa enorme riqueza microbiana em relação à fisiologia do equilíbrio da saúde-doença bucal.

Zaura et al. (2009) avaliaram a microbiota oral humana de 3 indivíduos saudáveis a fim de definir a diversidade, a singularidade e o nível de sobreposição dos 3 microbiomas. Amostras de diferentes superfícies dentárias, bochecha, palato duro, língua e saliva foram analisadas pela técnica de pirosequenciamento. Os resultados apresentaram predominantes taxas pertencentes aos Filos Firmicutes (gênero *Streptococcus*, família Veillonellaceae, gênero *Granulicatella*), Proteobacteria (gênero *Neisseria*, *Haemophilus*), Actinobacteria (gênero *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*), Bacteroidetes (gênero *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas*) e Fusobacteria (gênero *Fusobacterium*). De acordo com os autores, obteve-se a primeira perspectiva da diversidade e singularidade do microbioma oral saudável do indivíduo com uma resolução de sequenciamento de última geração, definindo assim o cerne da microbiota saudável.

Dominguez-Bello et al. (2010) caracterizaram comunidades bacterianas das mães e seus bebês recém-nascidos por pirosequenciamento, quatro nascidos de parto normal e seis por cesariana. Amostras da pele, mucosa oral e vagina das mães foram amostradas 1 hora antes do parto e dos recém-nascidos, pele, mucosa oral, e aspirado nasofaríngeo em um tempo < 5 minutos e < 24 horas, após o parto. Os resultados mostraram que os bebês de parto normal adquiriram comunidades bacterianas semelhantes a da microbiota vaginal de sua própria mãe, dominada por *Lactobacillus*, *Prevotella*, ou *Sneathia*

spp. Crianças nascidas de cesárea abrigaram comunidades bacterianas semelhantes aos encontrados na superfície da pele, dominados por *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, e *Propionibacterium* spp. Estes resultados estabelecem uma base importante para estudos do microbioma humano em habitats diferentes do corpo e seus efeitos associados na saúde da criança.

Ghannoum et al. (2010) avaliaram fungos presentes na cavidade oral de 20 indivíduos saudáveis, utilizando o pirosequenciamento. O estudo mostrou que em todas as amostras estudadas, a cavidade oral apresentou 74 gêneros de fungos cultiváveis e 11 não-cultiváveis. Entre estes gêneros, 39 estavam presentes em apenas uma pessoa, 16 gêneros estavam presentes em dois participantes, e 5 gêneros estavam presentes em três pessoas, enquanto 15 gêneros (incluindo os não-cultiváveis) estavam presentes em 4 (20%) dos participantes. Espécies de *Candida* foram os mais frequentes (isolado a partir de 75% dos participantes), seguido por *Cladosporium* (65%), *Aureobasidium*, *Saccharomycetales* (50% para ambos), *Aspergillus* (35%), *Fusarium* (30%), e *Cryptococcus* (20%). O número de espécies na cavidade oral de cada indivíduo variou entre 9 e 23.

Cephas et al. (2011) avaliaram o microbioma da saliva de crianças edêntulas e sua respectiva mãe ou cuidadora. Amostras foram coletadas de 5 bebês edêntulos com idade média de $4,6 \pm 1,2$ meses de idade e suas mães ou cuidadores primários. Em média, mais de 80.000 sequências por amostra foram geradas. Alta diversidade bacteriana foi observada na saliva de adultos (1012 unidades taxonômicas operacionais) e bebês (578 unidades taxonômicas operacionais). Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, e Fusobacteria estavam predominantes em todas as amostras. Um total de 397 gêneros de bactérias estava presentes em nosso conjunto de dados. Dos 28 gêneros diferentes entre crianças e adultos, 27 tinham uma maior prevalência em adultos. A exceção foi *Streptococcus*, que foi o gênero

predominante na saliva infantil (62,2% contra 20,4% em adultos). *Veillonella*, *Neisseria*, *Rothia*, *Haemophilus*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Leptotrichia*, e *Fusobacterium* foram também gêneros predominantes nas amostras infantis, enquanto *Haemophilus*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Oribacterium*, *Rothia*, *Treponema*, e *Actinomyces* predominaram nos adultos. Esse estudo demonstrou que uma rica comunidade bacteriana existe na cavidade bucal do lactente mesmo antes da erupção dentária.

Crielaard et al. (2011) avaliaram a composição microbiana oral de crianças (n=74, com idades entre 3-18 anos) na transição natural a partir da dentição decídua para uma dentição permanente e relataram os perfis microbianos para seu estado de saúde oral. A composição dos microrganismos de saliva foi avaliada por pirosequenciamento. Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria predominaram em todos os grupos. A dentição decídua abrigou uma maior proporção de Proteobacteria (Gammaproteobacteria, Moraxellaceae) do que Bacteroidetes, enquanto que todos os outros grupos Bacteroidetes foram tão abundantes como Proteobacteria. Bacteroidetes (principalmente gênero *Prevotella*), família Veillonellaceae e Espiroquetas aumentaram com a idade refletindo a maturação do microbioma impulsionado por mudanças biológicas com a idade.

Belda-Ferre et al. (2012) analisaram a cavidade oral humana sob as condições de saúde e doença, com foco em biofilme supragengival e cáries. Foram avaliados por pirosequenciamento 8 amostras com diferentes status de saúde oral. Estes dados mostraram que as cáries não são dominadas por *S. mutans* (a espécie originalmente identificada como o agente etiológico da cárie dentária), e sim por uma comunidade complexa formada por dezenas de espécies de bactérias, de acordo com a visão de que a cárie é uma doença polimicrobiana.

Jiang et al. (2013) analisaram por pirosequenciamento a região hipervariável do gene do RNAr 16S V1-V3 de amostras de biofilme

supragengival de 20 crianças saudáveis e 20 crianças com cárie precoce e severa da infância, entre 3 e 6 anos de idade. Três gêneros, *Streptococcus*, *Granulicatella*, e *Actinomyces*, foram encontrados com aumento significativo em crianças com cárie precoce e severa da infância. Estes dados podem facilitar o conhecimento da microbiota para posterior prevenção e tratamento de crianças com cárie precoce e severa da infância.

Ling et al. (2013) avaliaram a microbiota por pirosequenciamento 454 da saliva não estimulada de 10 jovens adultos entre 22 e 24 anos e 10 crianças entre 3 e 6 anos de idade com o objetivo de obter as características da microbiota de pacientes saudáveis. Tanto nos adultos quanto nas crianças a maioria das sequências pertencia aos gêneros *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Gemella*, *Rothia*, *Granulicatella*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Veillonella*, e *Aggregatibacter*, maiores constituintes da microbiota normal.

Xu et al. (2014) avaliaram o biofilme supragengival para caracterização filogenética de 10 crianças com cárie e 9 sem cárie, todas com menos de 30 meses e antes da erupção dos segundos molares usando a metodologia do sequenciamento 454 e relataram que algumas espécies, como *Streptococcus* e *Veillonella* estavam mais presentes em crianças abaixo de 30 meses com cáries em relação a cáries-free.

Jiang et al. (2014) avaliaram 60 crianças (3-7 anos de idade), incluindo 30 livres de cárie e 30 cárie ativa. O biofilme supragengival foi coletado de esmalte intacto, lesões de mancha branca, e cárie em dentina. As amostras foram analisadas pelo pirosequenciamento 454 nas regiões hipervariáveis V1-V3. Foram obtidos 25.444 diferentes filotipos, 18 filos e 145 gêneros. Reduzida diversidade bacteriana foi encontrada na dentina cariada em comparação com os outros grupos. Treze gêneros (incluindo *Capnocytophaga*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Abiotrophia*, *Comamonas*, *Tannerella*, *Eikenella*,

Paludibacter, *Treponema*, *Actinobaculum*, *Stenotrophomonas*, *Aestuariimicrobium* e *Peptococcus*) foram associados com saúde oral. Oito gêneros (incluindo *Cryptobacterium*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Olsenella*, *Scardovia*, *Shuttleworthia*, *Cryptobacterium* e *Streptococcus*) foram encontrados aumentados em cárie de dentina e *Actinomyces* e *Corynebacterium* estavam presentes significativamente em altos níveis em lesões de mancha branca ($p < 0,05$), enquanto *Flavobacterium*, *Neisseria*, *Bergeyella* e *Derxia* foram encontrados em esmalte entacto ($p < 0,05$). Os resultados mostram que a diversidade de bactérias orais é específica em diferentes status de progressão de cárie.

Gomar-Vercher et al. (2014) avaliaram a composição da microbiota oral por pirosequenciamento de pacientes em diferentes status de cárie. Foram coletadas 110 amostras de salivas de crianças com 12 anos de idade previamente divididos em 6 grupos de acordo com o status de cárie. Os resultados mostraram diferenças estatisticamente diferentes entre os grupos quanto às classes e gêneros. *Streptococcus* foi o gênero mais frequente em todos os grupos, no entanto não houve diferença entre os grupos. Em pacientes com cavidades de cárie, *Porphyromonas* e *Prevotella* apresentaram uma porcentagem aumentada quando comparado a indivíduos saudáveis. A diversidade bacteriana diminuiu com a severidade da doença. Assim, a variação entre os grupos foi grande, mas não houve claras diferenças, indicando que o uso de saliva não estimulada neste estudo possa não ser confiável.

Os recentes avanços nas técnicas de sequenciamento e bioinformática estão proporcionando novos horizontes no estudo de ecossistemas orais. Isto torna ainda mais interessante o estudo da ecologia microbiana em bebês, já que esta fase está diretamente relacionada com o desenvolvimento da saúde bucal quando adulto.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

Avaliar o desenvolvimento da microbiota oral de bebês atendidos em um programa de saúde bucal para primeira infância aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade e suas respectivas mães.

3.2 Objetivo específico

- a) Avaliar longitudinalmente a diversidade microbiana oral de bebês e suas respectivas mães por análise de pirosequenciamento;
- b) Avaliar a eficiência do protocolo da Bebê Clínica de Araçatuba para este estudo na prevenção de doenças bucais, através da avaliação de dieta, higiene bucal, presença de dentes, prevalência de cárie e condições periodontais de bebês e suas respectivas mães.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos Local da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP), seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa com seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, sob protocolo FOA 2011-00623 (Anexo A). As mães forneceram consentimento livre e esclarecido para a realização do trabalho (Apêndice A).

4.2 População alvo

As mães dos bebês participantes da Bebê Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP foram informadas a respeito dos objetivos e métodos de coleta de amostras clínicas do estudo e convidadas a participar da pesquisa.

Para avaliar a eficiência do protocolo da Bebê Clínica de Araçatuba para este estudo na prevenção de doenças bucais, um total de setenta e quatro pares de bebês aos 6 meses de idade e suas respectivas mães foi incluído no início do estudo.

Primeiramente, as mães foram convidadas a participar de uma palestra educativa e preventiva, 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, o paciente passou a integrar o quadro de participantes, sendo atendido com retornos agendados a cada 2 meses.

Os parâmetros clínicos de dieta, higiene bucal, erupção dentária, prevalência de cárie e condições periodontais foram avaliadas longitudinalmente, quando os bebês atingiram 6, 12, 18 e 24 meses de idade.

4.3 Caracterização do estudo

Trata-se de um estudo longitudinal que teve o objetivo de avaliar a eficácia de um protocolo preventivo na incidência de cárie dentária e avaliar a diversidade microbiana oral de bebês e suas mães aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade.

A coleta de dados deste estudo foi feita entre os meses de agosto de 2011 a março de 2013.

Uma população inicial de 74 bebês e suas respectivas mães foi avaliada aos 6 meses. Nesta oportunidade, informações acerca do protocolo preventivo adotado na Bebê Clínica da FOA/UNESP foram fornecidas às mães. Avaliações clínicas e coleta de amostras foram realizadas aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade dos bebês.

4.4 Seleção de pacientes e coleta de dados clínicos

4.4.1 Seleção de pacientes e protocolo preventivo adotado

O protocolo preventivo da Bebê-Clínica de Araçatuba/UNESP consta de alguns passos (Cunha et al., 2000 com modificações):

Passo 1: Para participar do programa, os pais ou responsáveis devem assistir a uma palestra educativa. A disposição dos pais para participar desta atividade educacional é reforçada pelo nascimento de seu bebê. Este é um momento em que há um desejo natural por parte dos pais de querer o melhor atendimento para seu filho. Assim, espera-se uma maior conformidade com as instruções do programa.

A palestra aborda temas importantes, tais como: 1) a necessidade de manter a saúde bucal no contexto da saúde geral; 2) a necessidade de criar hábitos alimentares de saúde; 3) o valor de manter os dentes decíduos saudáveis; 4) instruções sobre higiene para o cuidado tanto dos tecidos moles e duros; 5) como usar suprimentos de flúor; 6) explicações sobre o desenvolvimento de cárie dentária, desde as primeiras fases, tais como o aparecimento de uma mancha branca até a cárie precoce da infância.

Esta palestra tem a duração de 40 a 50 minutos e é seguido por um período de 15 minutos de perguntas e respostas que dá aos pais a oportunidade de expressar e resolver suas dúvidas.

Passo 2: Primeira visita. Na primeira visita são obtidos dados sobre a história completa de saúde da família, e um exame clínico bucal completo dos bebês. Os fatores de risco de cárie são avaliados como se segue:

- Paciente de baixo risco: os pacientes são classificados como tendo um baixo risco de cáries se: 1) a sua dieta não é cariogênica; 2) os pais estão conscientes da prevenção de doenças; 3) bebês que recebem higiene bucal regular; e 4) têm acesso ao flúor.

- Paciente de alto risco: os pacientes são classificados como tendo um alto risco de cárie, se: 1) a sua dieta é cariogênica; 2) se

eles são alimentados com mamadeira à noite; 3) higiene bucal precária ou ausente; 4) não têm nenhum contato com flúor ; e 5) os seus pais não têm conhecimento prévio sobre a importância da saúde bucal preventiva.

O protocolo para todos estes pacientes consiste em quatro visitas consecutivas, com intervalos e instruções de uma semana para os cuidados de higiene oral a ser realizada em casa.

Durante a primeira visita clínica, a cavidade bucal e os dentes são limpos com uma solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes e água filtrada/fervida (1:3) seguido por aplicação tópica de fluoreto de sódio (NaF 0,5%). Este é aplicado usando um *swab*, com quatro gotas de solução de fluoreto em cada extremidade; uma das quais é aplicada aos dentes superiores e o outro para os dentes inferiores.

Em casa, os pais devem manter os mesmos padrões de dieta e higiene e adicionar aplicações tópicas diárias de 0,05% NaF com um cotonete durante a noite antes do bebê dormir.

A avaliação do protocolo começa na segunda visita. Os pais são convidados a demonstrar os procedimentos de higiene oral que têm realizado em casa. Sua técnica é observada pela supervisão do dentista, que irá determinar se os procedimentos estão sendo realizados corretamente. As mães foram questionadas sobre quaisquer alterações nos hábitos alimentares dos bebês.

Estes procedimentos são repetidos na terceira e na quarta visita e o paciente passa a ser avaliado a cada 2 meses até os 4 anos de idade.

4.4.2 Avaliação Clínica e anamnese

Todos os exames clínicos e anamnese foram realizados por uma única profissional cirurgiã-dentista com especialização em

Odontopediatria. Inicialmente, os tecidos moles e dentes foram limpos utilizando uma gaze embebida em peróxido de hidrogênio diluído em água filtrada/fervida (3:1), seguindo o protocolo da Bebê-Clínica (FOA/UNESP). A avaliação clínica dos dentes limpos foi realizada com o bebê posicionado em macri (maca para criança) utilizando iluminação artificial e espelho clínico.

As condições periodontais dos bebês foram avaliadas sem o uso de sonda, pois há uma grande variabilidade na profundidade do sulco gengival durante a erupção dentária. O exame periodontal foi realizado avaliando a coloração e textura da gengiva e observação da presença de sangramento, inflamação gengival ou cálculo dentário. Todas as superfícies gengivais de todos os dentes foram avaliadas. Para exame das mães, a avaliação periodontal foi realizada por um examinador experiente usando o Periodontal Screening and Recording (PSR). O PSR é uma técnica de sondagem periodontal simples que foi desenhada para acelerar a triagem da doença periodontal (American Dental Association and American Academy of Periodontics, 1992). Uma sonda PSR metálica com extremidade arredondada de 0,5 mm e com uma banda colorida que se estende de 3,5 a 5,5 mm (CP-11.5B, Hu-Friedy) foi utilizada. A dentição foi dividida em sextantes e pontuada de acordo com a presença de sangramento 20 segundos após a sondagem, presença de biofilme e cálculo dentário e/ou restaurações deficientes e a posição da banda em relação à margem gengival. Somente a maior pontuação de cada sextante foi anotada (American Dental Association and American Academy of Periodontics, 1992). Os dentes foram posteriormente pontuados de acordo com os critérios sugeridos por Tekavec e Tekavec (1993) e Wallace (1994).

A prevalência de cárie foi avaliada utilizando o índice ceod (dentes decíduos cariados, extração indicada ou obturados) para os bebês ou CPO-D (dentes permanentes cariados, perdidos ou obturados) para as mães, de acordo com o sugerido pela Organização Mundial de

Saúde (1997), modificado por Cardoso et al. (2005) para incluir lesões não cavitadas (lesões de mancha branca ativas ou inativas). A erupção dentária foi observada e anotada.

4.4.3 Avaliação da dieta e da higiene bucal

Em todos os períodos experimentais, as mães foram entrevistadas para avaliação do cumprimento das orientações fornecidas.

A ingestão de alimentos foi avaliada de acordo com Llena e Forner (2008). Os alimentos foram classificados em nove categorias de acordo com a consistência, presença e tipo de açúcar: 1) Alimentos aderentes e ricos em açúcar (biscoito, doces, balas, gomas, frutas secas ou cristalizadas, doces que contenham açúcar, geléias, coberturas de sorvete, marmelada, pé de moleque); 2) Alimentos contendo açúcar e amido (leite com cereais doces, biscoito, produtos de padaria, chocolate); 3) Doces livres de açúcar; 4) Leite adoçado e produtos de uso diário (leite com achocolatado, flan, iogurtes e similares, sorvete, leite com açúcar, mel, papinhas doces); 5) Leite não adoçado e produtos de uso diário (leite puro, sorvete e iogurte sem açúcar, queijo, papinha salgada); 6) Líquidos adoçados (sucos industrializados e refrigerantes); 7) Frutas; 8) Alimentos ricos em amido semi-hidrolisado (pães industrializados, salgadinhos, batata frita industrializada); 9) Alimentos livres de açúcar (nozes, castanhas, massas).

As mães foram questionadas sobre os procedimentos de higiene bucal e sobre hábitos alimentares, particularmente o tipo de alimentação (aleitamento materno ou artificial) e aleitamento noturno.

4.5 Análise longitudinal da microbiota bucal de bebês e suas respectivas mães por pirosequenciamento

4.5.1 Coleta da amostra de saliva

A coleta da saliva dos bebês foi realizada antes dos procedimentos de avaliação clínica, uma vez que para realização da mesma precedeu-se a limpeza da cavidade bucal do bebê, podendo esta interferir nos resultados microbiológicos. As coletas foram realizadas durante o dia com o auxílio de *swabs* na região sublingual do bebê. Foram utilizados 4 *swabs* por bebê, cujas pontas ativas foram imediatamente armazenadas em tubos plásticos tipo *ependorfs* estéreis (Zaura et al., 2009). As amostras foram armazenadas a -80 °C até a análise.

Uma amostra da saliva estimulada total das mães também foi coletada. Para estimulação salivar foi orientado às mães que mastigassem o parafilme. A saliva foi depositada em coletores universais até a marca de 1 mL e posteriormente distribuída em tubos plásticos tipo *ependorfs* estéreis (Zaura et al., 2009). As amostras foram armazenadas a -80 °C até a análise. A saliva estimulada total das mães foi coletada para obtenção dos dados de diversidade microbiana nos adultos.

4.5.2 Coleta de amostra de biofilme dentário

A coleta de amostra de biofilme dentário dos bebês também foi realizada antes dos procedimentos de avaliação clínica. As coletas foram realizadas durante o dia com auxílio de *microbrush* estéril (Microbrush International, Grafton, USA). O biofilme dentário foi coletado

dos incisivos centrais superiores e quando estes não estavam presentes a coleta foi realizada dos incisivos centrais inferiores. Foram coletados 2 *microbrushs* por bebê. Em seguida, a ponta ativa do *microbrush* foi transferida para *eppendorfs* estéreis (Zaura et al., 2009). As amostras foram armazenadas a -80 °C até a análise.

Uma amostra do biofilme dentário das mães também foi coletada dos incisivos centrais superiores com auxílio de *microbrush*. Foram coletados 2 *microbrushs* por mãe. Em seguida, a ponta ativa do *microbrush* foi transferida para *eppendorfs* estéreis (Zaura et al., 2009). As amostras foram armazenadas a -80 °C até a análise.

4.6 Análise das amostras por pirosequenciamento

Para a seleção de amostras para a análise da diversidade microbiana oral de bebês aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade e suas respectivas mães, os seguintes critérios de inclusão foram adotados:

- a) Bebês e mães que não fizeram uso de antimicrobianos nos 3 meses que precederam a coleta de espécimes clínicos;
- b) pacientes não portadores de necessidades especiais;
- c) mães com mais de 15 elementos dentários.

Os parâmetros clínicos de todos os 74 pares de bebês/mães incluídos no estudo nos períodos de 6, 12, 18 e 24 meses foram analisados para a seleção dos pacientes.

Seguindo os critérios de exclusão adotados, foram selecionados 5 pares de bebês saudáveis e suas respectivas mães para a análise longitudinal. O critério de exclusão mais frequentemente observado nos bebês foi o uso de antibióticos.

Além disso, o bebê que desenvolveu lesões de cárie e sua respectiva mãe também foi avaliado, a fim de se verificar possíveis modificações no microbioma.

Assim, um total de 90 amostras foram incluídas na análise por pirosequenciamento nos períodos experimentais de 6, 12, 18 e 24 meses:

➤ **Amostras aos 6 meses de idade do bebê:**

Paciente 13: Saliva bebê (13SB6); Saliva Responsável (13SR6), Biofilme Responsável (13BR6);

Paciente 45: Saliva bebê (45SB6); Saliva Responsável (45SR6), Biofilme Responsável (45BR6);

Paciente 54: Saliva bebê (54SB6); Saliva Responsável (54SR6), Biofilme Responsável (54BR6);

Paciente 64: Saliva bebê (64SB6); Saliva Responsável (64SR6), Biofilme Responsável (64BR6);

Paciente 62: Saliva bebê (62SB6); Saliva Responsável (62SR6), Biofilme Responsável (62BR6);

Paciente 08: Saliva bebê (08SB6), Biofilme do bebê (08BB6); Saliva Responsável (08SR6), Biofilme Responsável (08BR6).

n total de amostras= 19

➤ **Amostras aos 12 meses de idade do bebê:**

Paciente 13: Saliva bebê (13SB12), Biofilme do bebê (13BB12); Saliva Responsável (13SR12), Biofilme Responsável (13BR12).

Paciente 45: Saliva bebê (45SB12), Biofilme do bebê (45BB12);
Saliva Responsável (45SR12), Biofilme Responsável (45BR12).

Paciente 54: Saliva bebê (54SB12); Saliva Responsável
(54SR12), Biofilme Responsável (54BR12).

Paciente 64: Saliva bebê (64SB12), Biofilme do bebê (64BB12);
Saliva Responsável (64SR12), Biofilme Responsável (64BR12).

Paciente 62: Saliva bebê (62SB12), Biofilme do bebê (62BB12);
Saliva Responsável (62SR12), Biofilme Responsável (62BR12).

Paciente 08: Saliva bebê (08SB12), Biofilme do bebê (08BB12);
Saliva Responsável (08SR12), Biofilme Responsável (08BR12).

n total de amostras= 23

➤ **Amostras aos 18 meses de idade do bebê:**

Paciente 13: Saliva bebê (13SB18), Biofilme do bebê (13BB18);
Saliva Responsável (13SR18), Biofilme Responsável (13BR18).

Paciente 45: Saliva bebê (45SB18), Biofilme do bebê (45BB18);
Saliva Responsável (45SR18), Biofilme Responsável (45BR18).

Paciente 54: Saliva bebê (54SB18), Biofilme do bebê (54BB18);
Saliva Responsável (54SR18), Biofilme Responsável (54BR18).

Paciente 64: Saliva bebê (64SB18), Biofilme do bebê (64BB18);
Saliva Responsável (64SR18), Biofilme Responsável (64BR18).

Paciente 62: Saliva bebê (62SB18), Biofilme do bebê (62BB18);
Saliva Responsável (62SR18), Biofilme Responsável (62BR18).

*Paciente 08: Saliva bebê (08SB18), Biofilme do bebê
(08BB18); Saliva Responsável (08SR18), Biofilme Responsável
(08BR18).

n total de amostras= 24

* Bebê que desenvolveu cárie aos 18 meses.

➤ **Amostras aos 24 meses de idade do bebê:**

Paciente 13: Saliva bebê (13SB24), Biofilme do bebê (13BB24);
Saliva Responsável (13SR24), Biofilme Responsável (13BR24).

Paciente 45: Saliva bebê (45SB24), Biofilme do bebê (45BB24);
Saliva Responsável (45SR24), Biofilme Responsável (45BR24).

Paciente 54: Saliva bebê (54SB24), Biofilme do bebê (54BB24);
Saliva Responsável (54SR24), Biofilme Responsável (54BR24).

Paciente 64: Saliva bebê (64SB24), Biofilme do bebê (64BB24);
Saliva Responsável (64SR24), Biofilme Responsável (64BR24).

Paciente 62: Saliva bebê (62SB24), Biofilme do bebê (62BB24);
Saliva Responsável (62SR24), Biofilme Responsável (62BR24).

Paciente 08: Saliva bebê (08SB24), Biofilme do bebê (08BB24);
Saliva Responsável (08SR24), Biofilme Responsável (08BR24).

n total de amostras= 24

4.6.1 Extração do DNA e Quantificação

Para a extração do DNA das 90 amostras foi utilizado o Qiamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Alemanha). Para a saliva do bebê e biofilmes, *swabs* e *microbrushs* foram imersos em tubos tipo *ependorfs* contendo 400 µl de solução enzimática (20 mg/ml de lisozima em 20 mM TrisCl, pH 8,0, 2 mM EDTA, 1,2% Triton). A seguir, o conjunto foi incubado por 40 minutos a 37 °C. Foi adicionado 20 µl de RNase A solução estoque (20 mg/ml) e, a seguir, 20 µl de proteinase K e 400 µl de Buffer AL. Seguiu-se incubação a 56 °C por 30 minutos e por mais 15 minutos a 95 °C. Após este período, os tubos foram levados à centrifugação a 8.000 rpm por 10 segundos. Foi adicionado a cada tubo 400 µl de etanol (96–100%) e os tubos foram agitados em vórtex. A seguir, cuidadosamente 700 µl da mistura foi transferida para QIAamp

Mini spin column. O material foi centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. O mesmo processo foi repetido mais duas vezes de acordo com o fabricante.

Paralelamente, foi adicionado ao QIAamp Mini spin column 500 µl de Buffer AW1 e então centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. A seguir, foi adicionado 500 µl de Buffer AW2 e então centrifugado a 14.000 rpm por 3 minutos. Adicionou-se 100 µl de Buffer AE e os tubos foram incubados 1 minuto e centrifugados a 8.000 rpm por 1 minuto.

A saliva da mãe foi diluída em PBS (1500 µl de PBS para 375 µl da saliva mãe). Este material foi centrifugado 10.000 rpm por 5 minutos e o *pellet* ressuspendido em 200 µl da mistura enzimática descrita acima. O restante do protocolo foi exatamente igual ao descrito acima para saliva do bebê e biofilme.

Imediatamente após a extração, a amostra de DNA foi submetida à análise de sua concentração e pureza determinadas através da leitura de absorbância em 260 nm (UV - Concentração do DNA em mg/ml = $Abs \times 100 \times 50 \mu\text{g/ml}$) e em 280 nm (quantificação de proteínas) no espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Scientific 2000, USA). A relação entre a quantidade de DNA e de proteína é usada como parâmetro para avaliação da qualidade do DNA extraído (grau de pureza) = $OD\ 260\ \text{nm} / OD\ 280\ \text{nm}$ Razão = 1,7-2,0. Amostras cujos valores são acima de 2,0 muito RNA; Amostras cujos valores são abaixo de 1,8 = contaminação com proteína. O DNA deve ter uma relação OD 260/280 de 1,8 ou mais.

Então, após avaliação da qualidade do DNA extraído, foi realizada a quantificação acurada de DNA com Qubit 2.0 Fluorometere (Invitrogen, Life Technologies, USA) e seus kits. O primeiro passo foi o preparo das soluções. Assim, a solução de trabalho do Qubit foi preparada diluindo o Qubit reagente 1:2000 em Buffer Qubit. Para cada amostra, 200 µl foram preparados da solução. Os tubos testes foram

preparados usando o protocolo conforme instruções do fabricante (Quadro 1):

Quadro 1 – Reação para quantificação acurada de DNA

	Padrão	Amostras
Volume da solução trabalho	190 μ L	180-199 μ L
Volume padrão	10 μ L	x
Volume de amostra para adicionar	x	1-20 μ L
Volume total em cada tubo	200 μ L	200 μ L

Após o preparo das amostras em tubo para PCR capacidade de 0,5 mL, os mesmos foram levados em vórtex por 3 segundos e então incubados a temperatura ambiente por 2 minutos. E, após a calibração do aparelho com amostras padrão, a leitura foi realizada com as amostras teste no Qubit® 2.0 Fluorometere.

4.6.2 Amplificação do gene 16S rRNA (PCR)

O gene 16S rRNA (região hipervariável V5-V6) foi amplificado utilizando o *forward* primer 785F (GGATTAGATACCCBRGTAGTC) e o *reverse* primer 1061R (TCACGRCACGAGCTGACGAC). Os primers incluem o 454 Life Sciences (Branford, CT, EUA) Adapter A (para *forward* primers) e B (para *reverse* primers) fundido à extremidade 5' da sequência do primer bacteriano do 16S rRNA.

A amplificação (Mastercycler, Eppendorf, USA) foi realizada seguindo o protocolo do FastStart High Fidelity PCR System

(Roche, Alemanha) e um volume final de 50 µl foi obtido com as soluções abaixo (Quadro 2):

Quadro 2 – Volumes de cada reagente utilizado na reação de PCR para amplificação do gene 16S rRNA

Reagente	Volume
10x Fast Start Buffer with MgCl ₂	5µl
dNTP Mix 10mM cada	1µl
DNA (100 ng)	5µl
Primer F e R	1µl cada
Fast Start High Fidelity Enzyme blend	1µl
Água	36 µl
Volume total	50 µl

Após o preparo do mix contendo os volumes mencionados de todos os reagentes (Quadro 2), 100 ng de DNA já quantificado e normalizado das amostras foi acrescentado.

Após o preparo, o seguinte ciclo para reação de amplificação foi utilizado: 95 °C por 4 minutos para ativação; seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto para desnaturação; 62 °C por 1 minuto para anelamento, 72 °C por 1 minuto e 30 segundos para extensão. A extensão final ocorreu na temperatura de 72 °C por 7 minutos.

Logo após a reação de PCR as amostras (produtos da amplificação), foram analisadas imediatamente por eletroforese em gel de agarose 1%. Utilizou-se gel de agarose a 1% (Invitrogen, Life Technologies, USA) em tampão de Trisborato EDTA (pH 8,0) e corado com Sybr Safe (0,1 ul/mL- Invitrogen, Life Technologies, USA). Foi incluído no primeiro poço de cada gel, um padrão de peso molecular de 100 bp (Invitrogen, Life Technologies, USA). Após o término de cada

corrida (80 volts por 45 minutos), as bandas foram observadas com auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta.

A documentação fotográfica dos géis foi obtida com o sistema Image Master-VDS (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) e a captura das imagens foram realizadas pelo programa LISCAP Image Capture software.

4.6.3 Purificação das amostras

Após a visualização das bandas, as amostras foram purificadas de acordo com o seguinte procedimento: as bandas foram cortadas e colocadas em tubos de 1,5 ml devidamente nomeados; então congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por pelo menos 4 horas; e centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi removido e então o material foi armazenado em um tubo de 0,2 mL e mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso.

Novamente, as amostras foram purificadas, agora com o reagente Agencourt AMPure XP (Agencourt Bioscience, USA) de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante. Foi adicionado 1,8 μl de AMPure XP para cada 1,0 μl de produto de PCR. O produto foi homogeneizado com pipeta 10 vezes; a placa (Agencourt Bioscience, USA) foi colocada sobre a base magnética e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Ainda com a placa sobre a base magnética, foi removido o sobrenadante sem perturbar as *beads*; a placa foi removida da base magnética e então foi adicionado 200 μl de etanol 70% em casa poço; novamente agitou-se levemente a placa 10 vezes. A placa foi incubada por 1 minuto sob a base magnética. Após, foi removido o sobrenadante sem perturbar as *beads*; novamente a placa foi removida da base magnética e 200 μl de etanol 70% foram adicionados em casa poço; novamente agitou-se levemente a placa 10 vezes. A placa foi incubada

por 1 minuto sob a base magnética. Após, foi removido o sobrenadante sem perturbar as *beads*. Após, a placa e a base foram previamente aquecidos a 40 °C até que todos os *pellets* estivessem totalmente secos (10-20 minutos). Cuidadosamente a placa e a base magnética foram removidas e 40 µl de 1X TE (Tris-EDTA) foram adicionados em cada poço. A placa foi removida da base magnética e os *pellets* foram ressuspendidos. A placa e a base magnética foram novamente incubadas por 2 minutos e o sobrenadante foi transferido para uma nova placa de PCR com 96 poços e selada e estocada a -20 °C.

Após a purificação, as amostras foram quantificadas utilizando-se o reagente PicoGreen (Invitrogen, Life Technologies, USA). Primeiro preparamos uma solução estoque de DNA a 2 µg/ml diluída em TE. Depois determinamos a concentração com base na absorbância em 260 nm utilizando cuvetas de vidro. Para o padrão foi utilizado DNA lambda a 100 µg/mL do kit Quant-i PicoGreen diluído 50 x in TE para o padrão de 2 µg/ml. Para a curva foi utilizado o DNA diluído a partir da solução estoque a 2 µg/mL DNA e então foi adicionado a solução de PicoGreen e incubados por 5 minutos. Após a incubação as amostras ou padrões foram quantificados (excitação ~ 480 nm, emissão ~ 520 nm).

4.6.4 Montagem dos *pools*

As amostras foram então utilizadas para a montagem do *pool* de amostras de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Moléculas / } \mu\text{l} = \frac{\text{concentração da amostra [ng/}\mu\text{l]} \times 6.022 \times 10^{23}}{656,6 \times 10^9 \text{ x tamanho do amplicon}}$$

Após o cálculo do número de moléculas presentes em cada amostra utilizou-se para o *pool*, 1×10^9 moléculas de cada amostra. Para isso foi utilizada a seguinte fórmula para a diluição:

$$\left(\frac{\text{Moléculas}/\mu\text{l} - 1}{10^9} \mu\text{l} \right)$$

Após o cálculo, o volume final de cada amostra foi acertado para 10 μl , de forma que o *pool* continha em seu volume final 10 x n=volume final (n=número de amostras).

Após o preparo do *pool*, diluiu-se para o sequenciamento na concentração de 1×10^7 moléculas, para isso adicionamos 2 μl do *pool* de amostras a 198 μl de água para biologia molecular. Após a montagem do *pools* as amostras foram enviadas para correr no 454 Roche FLX Titanium. As 90 amostras foram divididas em 2 *pools* com 45 amostras cada e então analisadas pelo pirosequenciamento 454 Roche FLX Titanium.

4.7 Análise dos resultados

Para avaliação longitudinal de dieta e higiene bucal foi utilizado o teste de *McNemar* com nível de significância de 5%. Dados de erupção dentária, prevalência de cárie e condições periodontais foram descritos.

Para as análises moleculares, foi utilizado o software Qiime 1.8 (<http://qiime.org/>) (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso et al., 2010) seguindo o pipeline de novo Operational Taxonomy Units (OTUs) em dados de 454. O QIIME compreende um pacote completo de programas livres utilizados principalmente para

comparação e análises de comunidades microbianas geradas através de plataformas de sequenciamento de alto desempenho.

Em seguida, as sequências em Standard Flowgram Format (SFF) foram extraídas para o formato FASTA utilizando o programa `sff_extract` 3.0 (http://bioinf.comav.upv.es/sff_extract/index.html) para cada pool de amostras. A próxima etapa foi identificar e contar amostras baseado em seu código de barras, foi utilizado o programa `split_libraries.py` do Qiime.

Os critérios utilizados para selecionar as melhores sequências foram: tamanho de 200 a 1000 pares de bases; score de qualidade Phred ≥ 20 ; tamanho máximo permitido de homopolímeros = 6 pares de bases; aceitamos bases truncadas (essa opção desabilita o teste para bases ambíguas); utilizamos a opção padrão para janela de qualidade = 0. As sequências onde o código de barras não foi identificado foram removidas do arquivo FASTA após o filtro.

Dessa maneira, as Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) foram definidas por agrupamento a 97% de similaridade utilizando como referência o banco de dados de OTUs mais recente (Fevereiro de 2012) do Greengenes com o método Uclust (Edgar, 2010). Para dar continuidade às análises, foi executado o passo para reservar apenas uma sequência (mais abundante) a qual é denominada de sequência representativa de cada OTU.

O alinhamento múltiplo das sequências representativas de cada OTU foi realizado pelo método PyNAST (Caporaso et al., 2010) utilizando o arquivo `core_set_aligned` do Greengenes disponível em <http://greengenes.lbl.gov/> como arquivo de comparação.

A diversidade microbiana em nível de Filos e Gêneros de bebês e mães foi descrita em gráficos comparativos. Sendo que, a comparação entre as amostras de saliva e biofilme do bebê ao longo do período experimental foram analisadas pelo teste de Friedman (GraphPadPrism6.0).

5 RESULTADOS

Um total de setenta e quatro pares de bebês e mães foi incluído no início do estudo. Este número foi de 70 aos doze meses, 66 aos dezoito meses e 58 aos vinte e quatro meses de idade do bebê. As principais causas de *drop-outs* foram desistência da adesão ao Programa e mudança de endereço.

Perfil da população-alvo

Todos os responsáveis pelos bebês foram representados pelas mães. A faixa etária média das mães foi de $29,9 \pm 4,94$.

A escolaridade da mãe pode estar relacionada com seus conhecimentos, costumes e hábitos. Assim, 32 mães apresentaram ensino superior completo, 32 segundo grau completo e os demais distribuídos entre superior incompleto (7), segundo grau incompleto (1), primeiro grau completo (1) e primeiro grau incompleto (1) (Figura 1).

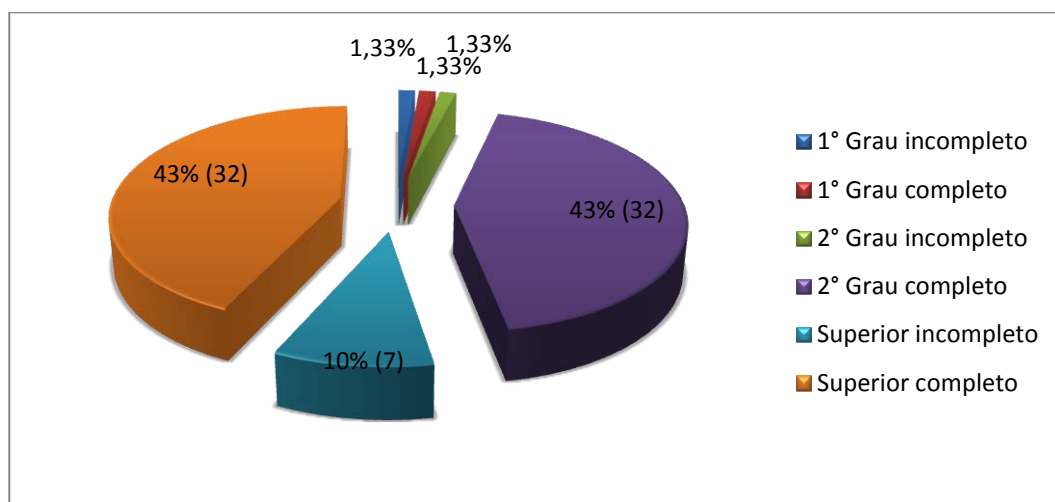


Figura 1 – Dados obtidos para escolaridade das mães.

A renda familiar foi classificada em salários mínimos (SM) e o nível sócio-econômico em alto (Acima de 60 SM), médio superior (De 35 a 59 SM), médio (De 15 a 34 SM), médio inferior (De 5 a 14 SM), baixo superior (De 3 a 4 SM) e baixo inferior (Abaixo de 3 SM) (Pastore e Silva, 2000). Assim, 51,0% apresentaram renda familiar entre 3 e 4 SM, 31,0% entre 5 a 14 SM, 14,0% abaixo de 3 SM e 4,0% acima de 15 a 34 SM (Figura 2).

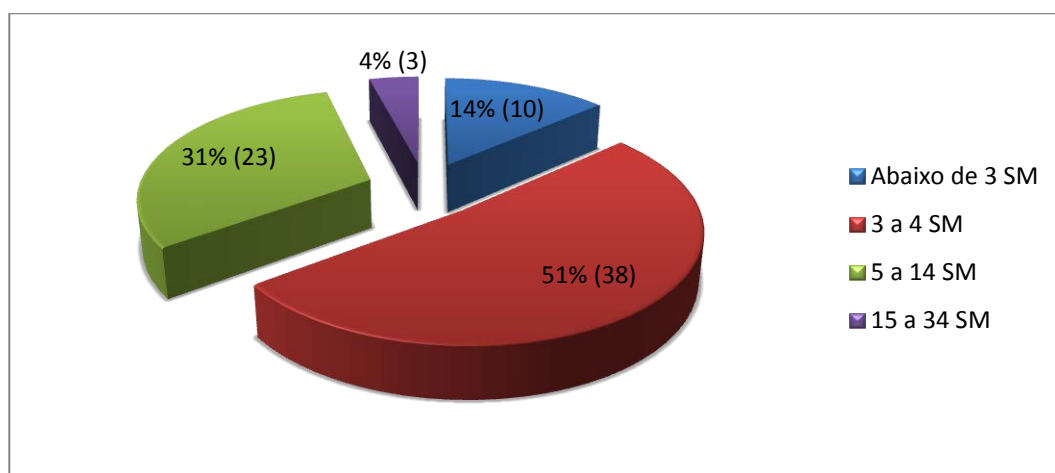


Figura 2 – Distribuição da renda familiar em salários mínimos (SM).

Dados clínicos dos bebês

Gênero

Mesmo considerando os *drop-outs* ocorridos durante o período experimental, observou-se que o percentual de representação dos gêneros mostrou-se equilibrada. A distribuição de gênero dos bebês aos seis meses de idade (n=74) foi de 54,0% do gênero masculino e 46,0% do gênero feminino. Aos doze meses (n=70), 53,0% eram do gênero masculino e 47,0% do gênero feminino. Aos dezoito meses (n=66), este percentual se manteve, observando-se também 53,0% do gênero masculino. Aos vinte e quatro meses (n=58), 52,0% dos bebês representaram o gênero masculino e 48,0% o gênero feminino.

Saúde geral dos bebês e terapia com fármacos antimicrobianos

Em relação à saúde geral dos bebês, observou-se que 7 nasceram prematuros. Um bebê foi submetido à cirurgia de hérnia inguinal aos 2 meses de idade e outros 2 ficaram hospitalizados por ocorrência de infecção urinária. Apenas 1 apresentou varicela aos três meses de idade.

Quanto à terapia antimicrobiana, observou-se que aos seis meses, 22,0% dos bebês foram submetidos à terapia antimicrobiana em função de complicações de gripes, infecções de garganta e urinária. Este percentual aumentou consideravelmente aos doze meses, no qual verificamos que 47,0% foram submetidos à terapia antimicrobiana. As

causas para o tratamento foram infecção de garganta, faringite, otite, pneumonia, infecção intestinal, infecção urinária ou candidose.

Aos dezoito meses, verificou-se que 35,0% dos bebês foram submetidos à terapia antimicrobiana por complicações de gripes ou infecção de garganta. Este percentual aumentou novamente e aos vinte e quatro meses, 50,0% foram tratados em algum momento com antimicrobianos para tratamento de sinusite, infecção de garganta e pneumonia.

Dieta

O quadro 3 apresenta os dados sobre hábitos de dieta relatados pelos responsáveis nos períodos de 6, 12, 18 e 24 meses de idade do bebê.

Apesar de ser preconizado pela OMS (Organização Mundial de Saúde, 1998) o aleitamento materno exclusivo até a faixa etária de 6 meses de idade, verificou-se que nesta faixa etária, apenas 33,0% dos bebês recebiam aleitamento materno. Um total de 43,0% recebiam aleitamento artificial e 24,0% associação de ambos. Aos doze meses, 20,0% dos bebês recebiam aleitamento materno. Este percentual aos dezoito meses foi de 14,0% e aos vinte e quatro meses de 7,0%. O percentual de aleitamento materno associado ao artificial ao doze meses foi de 13,0%, aos dezoito meses foi de 6,0% e aos vinte e quatro meses foi de 3,0%.

Com relação aos hábitos alimentares noturnos, que apresentam reflexos importantes na saúde bucal, observou-se que 66,0% dos bebês mamavam durante a noite aos seis meses de idade. No período de doze meses, este valor foi de 57,0% e aos dezoito meses de 44,0%. Não foi observada redução significativa aos 24 meses de idade

(28,0%) ($p = 0,850$). Outro dado adicional que também apresenta valores elevados durante todo o período experimental diz respeito ao hábito de dormir mamando. Um total de 58,0% dos bebês dormiam durante as mamadas aos seis meses de idade, 54,0%; aos doze meses, 44,0% aos dezoito meses e 38,0% aos 24 meses. Observou-se redução significativa do valor porcentual sobre o hábito de dormir mamando ao longo da avaliação ($p < 0,000$).

O consumo de alimentos cariogênicos como os pegajosos e ricos em açúcar não foi reportado aos seis meses de idade, porém aumentou significativamente aos vinte e quatro meses de idade (78,0%, $p < 0,000$). O uso de amido e açúcar foi pouco reportado aos seis meses de idade do bebê (9,0%), no entanto, aos 24 meses, o consumo aumentou significativamente (81,0%, $p < 0,000$). Leite adoçado e produtos de uso diário já faziam parte da dieta de 16,0% dos bebês aos seis meses de idade. Aos vinte e quatro meses, este número aumentou para 91,0% ($p < 0,000$), sendo este aumento estatisticamente significativo. Aos seis meses de idade, nenhum bebê teve contato com líquidos adoçados (sucos industrializados e/ou refrigerantes), já aos vinte e quatro meses 83,0% dos bebês fazia uso numa frequência média de 7 vezes por semana ($p < 0,000$). Dado de interesse, refere-se à precocidade da introdução destes alimentos em parte da população.

Quadro 3 – Dados sobre os hábitos alimentares dos bebês nos períodos de 6, 12, 18 e 24 meses. Os dados apresentados são percentuais em relação ao número total de bebês analisados em cada período

Dieta	Período de avaliação (percentual em relação ao n total no período)			
	6 meses (n=74)	12 meses (n=70)	18 meses (n=66)	24 meses (n=58)
Aleitamento				
- materno	33	20	14	7
- artificial	43	67	80	90
- misto	24	13	6	3
Dorme enquanto mama	58	54	44	38
Mamadas noturnas	66	57	44	28
Alimentação aderente e rica em açúcar	0	9	65	78
Alimentação com amido e açúcar	9	83	92	81
Doces livres de açúcar	0	0	0	0
Leite adoçado e produtos de uso diário	16	60	86	91
Leite não adoçado e produtos de uso diário	99	100	100	100
Bebidas adoçadas	0	17	74	83
Frutas	95	99	100	100
Alimentos ricos em amido semi- hidrolisado	4	69	86	88
Alimentos livres de açúcar	1	44	100	97

Higiene bucal

Aos seis meses de idade do bebê, 59,0% das mães declararam realizar procedimento de higiene bucal utilizando gaze ou fralda embebida em água. Um total de 41,0% responderam não ter o hábito de higienizar a boca dos bebês. Com a participação das mães no programa preventivo, observou-se aumento da porcentagem de mães que realizavam procedimento de higiene bucal para 94,0% aos doze meses de idade do bebê, sendo que destes 94,0% usavam gaze ou fralda embebida em peróxido de hidrogênio 10 volumes e água filtrada/fervida (1:3) de acordo com o protocolo da bebê clínica e 6,0% usavam escova e dentifrício sem flúor; aos dezoito meses este percentual foi para 98,0%, sendo que 62,0% realizavam a higiene com escova e dentifrício sem flúor e 38,0 com gaze ou fralda de acordo com protocolo; aos vinte e quatro meses a porcentagem foi de 100,0 ($p < 0,000$), sendo que, 97,0% usavam escova dental e dentifrício e 3,0% gaze ou fralda de acordo com protocolo.

Quanto ao hábito de higiene noturna 58,0% declararam realizar o mesmo aos seis meses de idade do bebê. Fornecida as orientações de higiene noturna para as mães (higiene da cavidade oral e dentes com gaze ou fralda e uma solução de peróxido de hidrogênio e água filtrada/fervida 3:1, ou escova de dente e dentifrício sem flúor, seguido pela aplicação de flúor tópico 0,05% com cotonete nos dentes superiores e inferiores, antes do bebê dormir) este hábito aos doze meses aumentou para 67,0%, e aos dezoito meses para 77,0%, chegando a um total de 90,0% aos vinte e quatro meses ($p < 0,000$).

Condições bucais dos bebês: Erupção dentária, condição gengival e prevalência de cárie

Aos seis meses, 70,0% dos bebês apresentaram-se edêntulos e seus roletes gengivais e tecidos moles bucais apresentaram condição de normalidade. Dezenove bebês (26,0%) apresentaram na cavidade bucal os incisivos centrais inferiores (71 e 81), e três bebês apresentaram mais de 2 dentes. A prevalência de cárie (ceo-d) neste período experimental foi igual a 0.

Aos doze meses, 10,0% dos bebês apresentaram-se edêntulos, 29,0% apresentaram até 4 dentes e 61,0%, mais de 4 dentes. Os roletes gengivais e tecidos moles bucais apresentaram condição de normalidade. Aos dezoito meses, um total de 68,0% dos bebês apresentaram na cavidade bucal incisivos e molares, exceto caninos. Apenas 27,0% apresentaram todos os grupos de dentes decíduos (incisivos, caninos e molares) e ainda 5,0% apresentaram apenas os incisivos. As condições de tecidos moles bucais também apresentaram condições de normalidade. Em relação à prevalência de cárie (ceo-d) apenas 1 bebê (1,51%) apresentou lesão de cárie nos incisivos centrais superiores e lesão de mancha branca no incisivos laterais superiores.

Aos vinte e quatro meses, 90,0% dos bebês apresentaram na cavidade bucal todos os grupos de dentes decíduos (incisivos, caninos e molares). Apenas 10,0% apresentaram ausência do grupo caninos. As condições de tecidos moles bucais também apresentaram condições de normalidade. Em relação à prevalência de cárie (ceo-d) apenas 1 bebê (1,7%) apresentava manchas brancas inativas e cavidades de cárie estabilizadas.

Dados clínicos da mãe

Saúde geral das mães e terapia com fármacos antimicrobianos

O porcentual de mães que se submeteram a alguma terapia antimicrobiana foi de 12,0% aos seis meses de idade do bebê, 11,0% aos doze meses, 35,0% aos dezoito meses e 14,0% aos vinte e quatro meses. As causas foram infecção de garganta ou extração de dentes.

Condições bucais das mães: Prevalência de cárie

O índice CPO-D coletivo nos períodos experimentais foi calculado de acordo com a fórmula a seguir: $CPO-D \text{ coletivo} = \frac{\text{soma dos dentes permanentes cariados} + \text{perdidos} + \text{obturados} + \text{mancha branca ativa} + \text{mancha branca inativa}}{n^{\circ} \text{ de indivíduos examinados}}$. Os dados individuais dos números de dentes cariados, perdidos e obturados (CPO-D) das mães estão apresentados em Apêndice D.

O CPO-D coletivo obtido para o grupo de mães aos 6 meses de idade do bebê foi de 10,27, aos 12 meses foi de 10,12, aos 18 meses foi de 10,15 e os 24 meses 10,06.

Condições bucais das mães: Condições periodontais

Com relação às condições periodontais da mãe, observou-se os seguintes sinais clínicos: sangramento ao exame periodontal (6 meses de idade do bebê – 7,0%, 12 meses – 20,0%, 18 meses – 17,0%; 24 meses – 14,0%) e sangramento e presença de cálculo (6 meses de idade do bebê– 9,0%, 12 meses – 13,0%, 18 meses – 10,0%; 24 meses – 19,0%).

As mães foram encaminhadas ao Serviço de Triagem da FOA/UNESP para solucionamento das necessidades de tratamento.

Análise longitudinal da microbiota bucal de bebês por pirosequenciamento

Para a seleção dos 5 pares de bebês e mães para a análise de pirosequenciamento, foram analisados além dos critérios de inclusão, os perfis de dieta, higiene bucal, presença de dentes, prevalência de cárie e condições periodontais dos bebês (Apêndice E), com o objetivo de obter uma amostra o mais homogênea possível de bebês com saúde geral e bucal e sem ocorrência de cáries.

Saliva

A análise longitudinal da microbiota da saliva dos 5 bebês mostrou a ocorrência de 7 filos em diferentes prevalências ao longo do tempo. Foram observados os filos: Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Fusobacteria, TM7 e SR1. A distribuição porcentual de Filos está apresentada no Quadro 4.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas porcentagens médias de Actinobacteria ($p = 0,5612$), Bacteroidetes ($p = 0,0666$), Proteobacteria ($p = 0,1163$), Fusobacteria ($p = 0,3461$), TM7 ($p = 0,0532$) e SR1 ($p = 0,2500$) quando comparados os períodos de 6, 12, 18 e 24 meses (Figura 3).

Diferenças estatisticamente significativas na presença de Firmicutes foram observadas entre os períodos de 6 e 18 meses ($p = 0,0014$). Redução do percentual representativo deste Filo foi observada ao longo dos períodos de avaliação (6 meses = $74,18 \pm 7,38$; 12 meses = $55,74 \pm 12,64$; 18 meses = $47,64 \pm 10,74$ e 24 meses = $47,82 \pm 16,73$) (Figura 4).

Quadro 4 – Porcentagem média e desvio-padrão de ocorrência dos Filos nas amostras de saliva dos bebês nos períodos de avaliação 6, 12, 18 e 24 meses

Filo	Período de avaliação				Valor de p*
	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses	
Actinobacteria	2,06 (1,63)	0,86 (0,69)	3,98 (5,40)	7,18 (10,26)	0,5612
Bacteroidetes	5,7 (7,43)	14,02 (4,59)	9,5 (3,06)	13,78 (5,23)	0,0666
Firmicutes	74,18 (7,38)	55,74 (12,64)	47,64 (10,74)	47,82 (16,73)	0,0087
Proteobacteria	1,30 (1,16)	6,90 (5,83)	11,10 (9,22)	9,08 (7,15)	0,1163
Fusobacteria	0,54 (0,69)	1,72 (1,15)	2,12 (3,06)	1,78 (2,09)	0,3461
TM7	0,16 (0,36)	0,22 (0,22)	3,4 (4,87)	0,50 (0,41)	0,0532
SR1	0 (0)	0,02 (0,04)	0,02 (0,04)	0,12 (0,21)	0,2500

*Diferenças estatisticamente significantes $p < 0,05$.

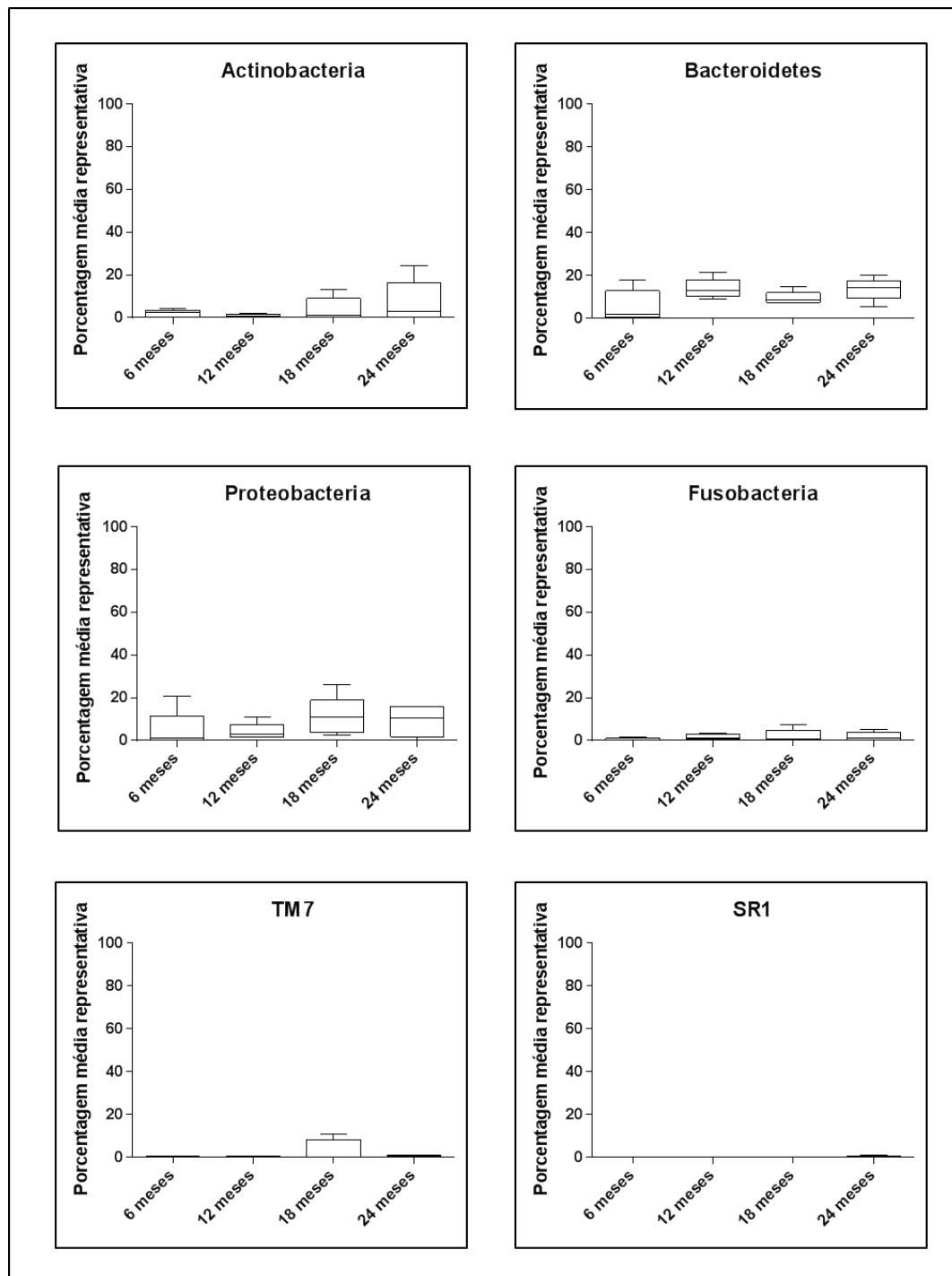


Figura 3 – Porcentagem média de diferentes Filos observados nas amostras de saliva dos bebês aos 6, 12, 18 e 24 meses.

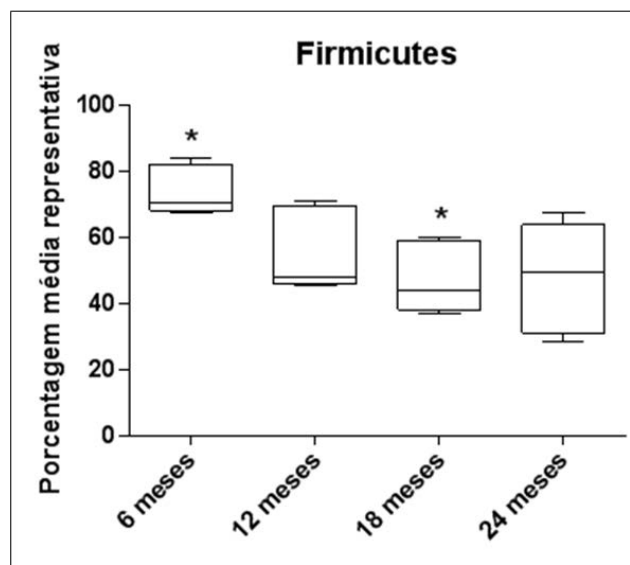


Figura 4 – Porcentagem média do Filo Firmicutes na saliva dos bebês aos 6, 12, 18 e 24 meses. Os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Foram identificados 30 gêneros nas amostras de saliva dos bebês aos seis meses de idade. Observou-se um aumento considerável da diversidade de gêneros entre os seis e doze meses, sendo que foram identificados 44 gêneros nas amostras coletadas no primeiro ano de vida. Aos dezoito e vinte e quatro meses, o número de gêneros presentes não apresentou elevação considerável, mantendo-se em 45 e 40, respectivamente (Quadro 5).

Observou-se a redução da detecção de novos gêneros ao longo dos períodos experimentais. Aos doze meses de vida do bebê, observou-se que 20 novos gêneros foram detectados quando comparado com o observado aos 6 meses. Aos dezoito meses, 7 novos gêneros foram detectados. Aos 24 meses, foram detectados apenas 4 novos gêneros. Vinte e quatro gêneros foram comuns a todos os períodos experimentais.

O gênero *Streptococcus* foi observado em todos os períodos experimentais com os maiores percentuais de ocorrência. Aos

seis meses de vida do bebê, destacam-se ainda a presença dos gêneros *Gemella* spp., *Granulicatella* spp., [*Prevotella*] spp. (família Paraprevotellaceae), *Rothia* spp. e *Veillonella* spp. Aos doze meses, somam-se aos gêneros citados a detecção de *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Neisseria* spp. e *Haemophilus* spp. O gênero *Burkholderia* aparece com ocorrência aumentada proporcionalmente aos dezoito meses de vida do bebê. Ainda, aos dezoito meses ocorreu um aumento na porcentagem média do gênero *Actinomyces* que persiste aos vinte e quatro meses de idade do bebê.

Aos vinte e quatro meses de idade do bebê além dos gêneros acima citados ganham destaque os gêneros *Capnocytophaga* spp., *Corynebacterium* spp. e *Leptotrichia* spp. *Pedobacter* spp., *Lactobacillus* spp. e *Treponema* spp. foram identificados em porcentagens baixas somente aos seis meses de idade do bebê, não sendo detectados aos 12, 18 e 24 meses.

Quadro 5 – Porcentagem média e desvio-padrão de ocorrência dos gêneros nas amostras de saliva dos bebês nos períodos de avaliação 6, 12, 18 e 24 meses*

(continua)

Gêneros	Períodos experimentais			
	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
<i>Actinobacillus</i> spp.	0,03 (0,03)	0,38 (0,49)	0,99 (1,56)	0,40 (0,38)
<i>Actinomyces</i> spp.	0,64 (0,73)	0,41 (0,30)	2,73 (3,78)	1,77 (2,14)
<i>Aggregatibacter</i> spp.	0,01 (0,01)	0,05 (0,05)	0,03 (0,03)	0,01 (0,03)
<i>Burkholderia</i> spp.	0,08 (0,18)	0,02 (0,05)	5,22 (11,67)	0,57 (1,27)
<i>Capnocytophaga</i> spp.	0,03 (0,07)	0,29 (0,21)	0,76 (1,27)	2,00 (2,73)
<i>Coprococcus</i> spp.	0,01 (0,01)	0,005 (0,01)	0,002 (0,005)	0,005 (0,01)
<i>Corynebacterium</i> spp.	0,07 (0,09)	0,12 (0,12)	0,54 (0,93)	1,23 (1,69)
<i>Fusobacterium</i> spp.	0,15 (0,15)	1,27 (1,16)	1,33 (1,73)	0,30 (0,40)
<i>Gemella</i> spp.	1,28 (1,50)	0,45 (0,45)	0,24 (0,20)	0,83 (0,85)
<i>Granulicatella</i> spp.	5,17 (6,25)	10,79 (8,73)	7,92 (2,60)	7,45 (3,72)
<i>Haemophilus</i> spp.	0,38 (0,60)	2,52 (2,75)	2,34 (2,18)	1,05 (1,18)
<i>Lautropia</i> spp.	0,01 (0,02)	0,04 (0,04)	0,04 (0,05)	0,48 (0,62)
<i>Leptotrichia</i> spp.	0,37 (0,68)	0,30 (0,31)	0,77 (1,42)	1,46 (2,10)

Quadro 5 – Porcentagem média e desvio-padrão de ocorrência dos gêneros nas amostras de saliva dos bebês nos períodos de avaliação 6, 12, 18 e 24 meses*

(continuação)

Gêneros	Períodos experimentais			
	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
<i>Neisseria</i> spp.	0,36 (0,32)	3,32 (2,92)	2,25 (1,87)	3,35 (3,93)
<i>Oribacterium</i> spp.	0,02 (0,03)	0,03 (0,03)	0,004 (0,005)	0,01 (0,03)
<i>Phascolarctobacterium</i> spp.	0,03 (0,04)	0,01 (0,02)	0,02 (0,02)	0,01 (0,02)
<i>Porphyromonas</i> spp.	0,20 (0,26)	3,37 (1,84)	3,68 (5,47)	4,70 (4,52)
[<i>Prevotella</i>] spp.	4,29 (6,91)	7,92 (5,55)	2,22 (2,71)	3,05 (4,11)
<i>Prevotella</i> spp.	0,73 (1,46)	1,36 (1,73)	2,18 (2,20)	2,15 (2,28)
<i>Pseudomonas</i> spp.	0,01 (0,01)	0,002 (0,005)	0,005 (0,01)	0,95 (2,10)
<i>Rothia</i> spp.	1,34 (1,29)	0,33 (0,32)	0,70 (0,84)	3,51 (5,52)
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,18 (0,30)	0,58 (0,77)	1,07 (1,02)	0,16 (0,31)
<i>Streptococcus</i> spp.	50,9 (8,95)	30,41 (11,40)	28,66 (10,56)	31,26 (16,85)
<i>Veillonella</i> spp.	11,5 (5,98)	9,35 (8,08)	4,79 (6,47)	3,65 (4,63)
<i>Campylobacter</i> spp.	0,01 (0,03)	0,01 (0,03)	0,01 (0,01)	0 (0)
<i>Selenomonas</i> spp.	0,01 (0,01)	0,50 (1,12)	0,002 (0,006)	0 (0)
<i>Moryella</i> spp.	0,01 (0,02)	0 (0)	0,01 (0,02)	0,02 (0,05)
<i>Lactobacillus</i> spp.	0,01 (0,01)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Pedobacter</i> spp.	0,01 (0,01)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Treponema</i> spp.	0,01 (0,03)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Cardiobacterium</i> spp.	0 (0)	0,02 (0,04)	0,01 (0,02)	0,01 (0,02)
<i>Catonella</i> spp.	0 (0)	0,03 (0,04)	0,004 (0,005)	0,03 (0,06)
<i>Kingella</i> spp.	0 (0)	0,01 (0,01)	0,01 (0,01)	0,04 (0,05)
<i>Mogibacterium</i> spp.	0 (0)	0,002 (0,005)	0,002 (0,005)	0,002 (0,005)
<i>Vagococcus</i> spp.	0 (0)	0,002 (0,004)	0,003 (0,006)	0,002 (0,005)
<i>Eikenella</i> spp.	0 (0)	0,05 (0,12)	0,07 (0,10)	0,30 (0,67)
<i>Atopobium</i> spp.	0 (0)	0,002 (0,005)	0,005 (0,010)	0 (0)
<i>Megasphaera</i> spp.	0 (0)	0,02 (0,04)	0,005 (0,010)	0 (0)
<i>Moraxella</i> spp.	0 (0)	0,01 (0,02)	0,005 (0,011)	0 (0)
<i>Peptococcus</i> spp.	0 (0)	0,002 (0,005)	0,002 (0,005)	0 (0)
<i>Syntrophomonas</i> spp.	0 (0)	0,01 (0,02)	0,004 (0,006)	0 (0)
<i>Facklamia</i> spp.	0 (0)	0,002 (0,005)	0 (0)	0,002 (0,005)
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	0 (0)	0,002 (0,005)	0 (0)	0,005 (0,010)
[<i>Ruminococcus</i>] spp.	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,006)	0,002 (0,005)
<i>Propionibacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,01)	0,19 (0,42)
<i>Alloiococcus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,01)	0,01 (0,03)

Quadro 5 – Porcentagem média e desvio-padrão de ocorrência dos gêneros nas amostras de saliva dos bebês nos períodos de avaliação 6, 12, 18 e 24 meses*

(conclusão)

Gêneros	Períodos experimentais			
	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
<i>Acinetobacter</i> spp.	0 (0)	0,005 (0,011)	0 (0)	0 (0)
<i>Chryseobacterium</i> spp.	0 (0)	0,002 (0,005)	0 (0)	0 (0)
<i>Microbacterium</i> spp.	0 (0)	0,002 (0,005)	0 (0)	0 (0)
<i>Scardovia</i> spp.	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)	0 (0)
<i>Tannerella</i> spp.	0 (0)	0,02 (0,05)	0 (0)	0 (0)
<i>Conchiformibius</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,005)	0 (0)
<i>Nesterenkonia</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,005)	0 (0)
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>TG5</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,006)	0 (0)
<i>Abiotrophia</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,02)
<i>Janthinobacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,19 (0,42)
<i>Parvimonas</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,02)
<i>Sphingomonas</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,19 (0,42)

*Porcentagens mais relevantes em negrito.

Biofilme

A análise longitudinal da microbiota do biofilme dos bebês mostrou a ocorrência de 8 filos em diferentes prevalências ao longo do tempo. Foram observados os filos: Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Fusubacteria, Proteobacteria, TM7 e SR1. Também foi observado Aquificae e Tenericutes em percentuais bem reduzidos. A distribuição percentual de Filos está apresentada no Quadro 6. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas

porcentagens médias de Filos observados quando comparados os períodos de 6, 12, 18 e 24 meses (Figura 5).

Quadro 6 – Porcentagem média e desvio-padrão de ocorrência dos Filos nas amostras de biofilme dos bebês nos períodos de avaliação 6, 12, 18 e 24 meses

Filo	Período de avaliação			Valor de p*
	12 meses	18 meses	24 meses	
Actinobacteria	7,53 (6,73)	21,16 (12,30)	24,78 (19,2)	0,3673
Bacteroidetes	4,18 (2,35)	9,4 (10,48)	14,96 (14,7)	0,3673
Firmicutes	52,53 (20,84)	39,16 (14,93)	25,22 (14,5)	0,0093
Proteobacteria	17,18 (9,40)	7,2 (7,49)	9,66 (8,57)	0,0934
Fusobacteria	0,68 (0,66)	1,06 (0,67)	1,16 (0,83)	0,6914
TM7	0,1 (0,08)	0,58 (0,59)	2,24 (4,13)	0,1204
SR1	0,05 (0,1)	0 (0)	0,1 (0,17)	0,4444
Aquificae	0,03 (0,05)	0 (0)	0 (0)	0,9999
Tenericutes	0,03 (0,05)	0 (0)	0 (0)	0,9999
Cyanobacteria	0,55 (1,10)	0 (0)	0 (0)	0,9999

*Diferenças estatisticamente significantes $p < 0,05$.

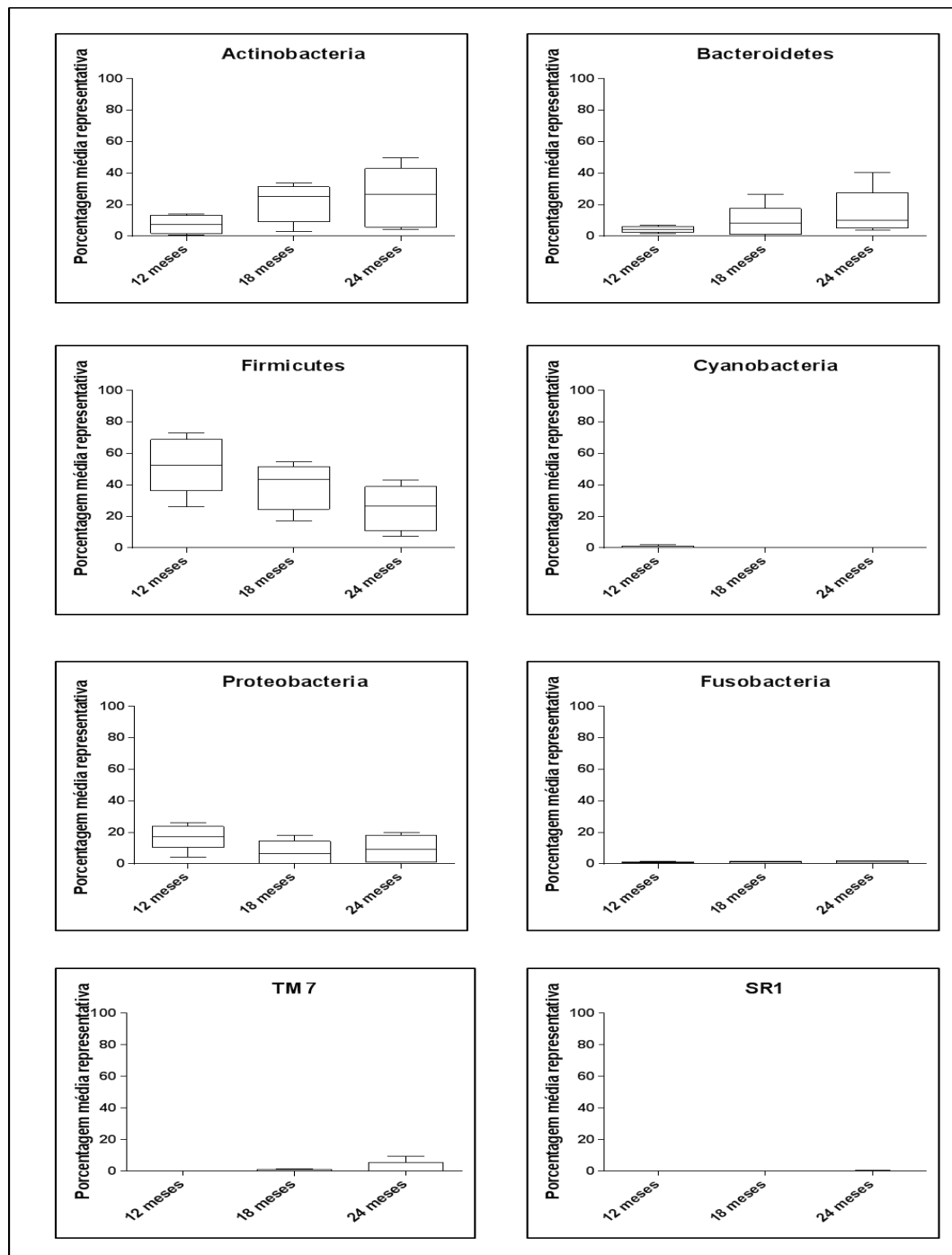


Figura 5 – Porcentagens médias de diferentes Filos observados nas amostras de biofilme dos bebês aos 6, 12, 18 e 24 meses.

O Quadro 7 apresenta as porcentagens médias e desvios-padrão de ocorrência dos gêneros nas amostras de biofilme dos bebês nos períodos de avaliação de 12, 18 e 24 meses. Aos seis meses de idade, nenhum dos 5 bebês avaliados apresentava dentes erupcionados que permitissem a coleta de biofilme dentário.

Foram detectados 77 gêneros nas amostras de biofilme dentário aos 12 meses de idade do bebê. Observou-se decréscimo do número de gêneros presentes (n=52) no biofilme dentário aos 18 meses em relação à avaliação anterior. Aos 24 meses, o número de gêneros se manteve em 53.

Um total de 35 gêneros foi detectado em todos os períodos experimentais. Chama atenção o grande número de gêneros detectados apenas na primeira coleta, já que vinte e cinco gêneros foram detectados apenas nesta coleta, não sendo posteriormente verificados aos 18 e 24 meses.

Observou-se predomínio do gênero *Streptococcus* spp. em todos os períodos experimentais, porém em porcentagem reduzida ao encontrado na saliva. Aos 12 meses, destacam-se ainda os gêneros *Actinomyces* spp., *Capnocytophaga* spp., *Corynebacterium* spp., *Gemella* spp., *Granulicatella* spp., *Haemophilus* spp., *Neisseria*, *Porphyromonas* spp., *Pseudomonas* spp. e *Propionibacterium* spp.

Aos 18 meses, detectou-se em porcentagens representativas os gêneros *Actinomyces* spp., *Burkholderia* spp., *Capnocytophaga* spp., *Corynebacterium* spp., *Granulicatella* spp., *Neisseria* spp., *Rothia* spp., *Veillonella* spp. Aos 24 meses, os gêneros *Corynebacterium* spp., *Capnocytophaga* spp., *Prevotella* spp., *Rothia* spp. foram encontrados com maior ocorrência em relação aos demais períodos experimentais.

Quadro 7 – Porcentagem média e desvio-padrão de ocorrência dos gêneros nas amostras de biofilme dos bebês nos períodos de avaliação 12, 18 e 24 meses*

(continua)

Gêneros	Períodos experimentais		
	12 meses	18 meses	24 meses
<i>Abiotrophia</i> spp.	0,03 (0,06)	0,09 (0,08)	0,18 (0,39)
<i>Acinetobacter</i> spp.	0,07 (0,14)	0,003 (0,006)	0,003 (0,007)
<i>Actinobacillus</i> spp.	0,73 (0,78)	0,06 (0,08)	0,06 (0,09)
<i>Actinomyces</i> spp.	3,95 (6,67)	13,23 (12,12)	6,34 (5,81)
<i>Bosea</i> spp.	0,12 (0,21)	0,01 (0,02)	0,02 (0,03)
<i>Burkholderia</i> spp.	0,19 (0,27)	1,21 (2,59)	0,39 (0,80)
<i>Capnocytophaga</i> spp.	1,91 (3,09)	7,01 (10,98)	10,22 (9,93)
<i>Cardiobacterium</i> spp.	0,19 (0,38)	0,04 (0,05)	0,77 (1,02)
<i>Catonella</i> spp.	0,02 (0,04)	0,01 (0,01)	0,02 (0,05)
<i>Cloacibacterium</i> spp.	0,04 (0,09)	0,01 (0,03)	0,01 (0,01)
<i>Corynebacterium</i> spp.	1,07 (1,44)	3,27 (2,29)	10,84 (10,85)
<i>Eikenella</i> spp.	0,25 (0,42)	0,16 (0,28)	0,09 (0,18)
<i>Flavobacterium</i> spp.	0,14 (0,26)	0,01 (0,02)	0,003 (0,008)
<i>Fusobacterium</i> spp.	0,31 (0,39)	0,25 (0,20)	0,61 (0,54)
<i>Gemella</i> spp.	1,09 (1,21)	0,86 (0,86)	0,56 (0,87)
<i>Granulicatella</i> spp.	3,06 (2,87)	5,12 (9,17)	2,78 (1,99)
<i>Haemophilus</i> spp.	1,43 (1,42)	2,79 (5,86)	0,54 (0,96)
<i>Kingella</i> spp.	0,45 (0,87)	0,17 (0,31)	0,53 (0,98)
<i>Lautropia</i> spp.	0,92 (1,83)	0,60 (1,02)	0,59 (0,59)
<i>Leptotrichia</i> spp.	0,19 (0,25)	0,81 (0,72)	0,53 (0,49)
<i>Moraxella</i> spp.	0,01 (0,03)	0,02 (0,05)	0,10 (0,22)
<i>Mycobacterium</i> spp.	0,05 (0,06)	0,01 (0,03)	0,003 (0,008)
<i>Neisseria</i> spp.	3,53 (5,41)	1,33 (1,20)	3,47 (5,17)
<i>Oribacterium</i> spp.	0,01 (0,02)	0,01 (0,02)	0,01 (0,01)
<i>Porphyromonas</i> spp.	1,30 (1,44)	0,86 (0,97)	1,30 (1,33)
[<i>Prevotella</i>] spp.	0,09 (0,11)	0,08 (0,15)	0,07 (0,09)
<i>Prevotella</i> spp.	0,11 (0,14)	0,72 (0,99)	2,31 (4,77)
<i>Propionibacterium</i> spp.	2,02 (3,37)	0,12 (0,18)	0,04 (0,05)
<i>Pseudomonas</i> spp.	7,47 (9,95)	0,28 (0,34)	0,38 (0,45)
<i>Ralstonia</i> spp.	0,05 (0,08)	0,002 (0,004)	0,01 (0,01)
<i>Rothia</i> spp.	0,19 (0,11)	4,32 (7,53)	6,70 (5,64)

Quadro 7 – Porcentagem média e desvio-padrão de ocorrência dos gêneros nas amostras de biofilme dos bebês nos períodos de avaliação 12, 18 e 24 meses*

(continuação)

Gêneros	Períodos experimentais		
	12 meses	18 meses	24 meses
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,21 (0,15)	0,02 (0,02)	0,21 (0,32)
<i>Streptococcus</i> spp.	17,43 (7,78)	26,57 (13,35)	17,25 (11,17)
<i>Turcibacter</i> spp.	0,01 (0,01)	0,01 (0,01)	0,01 (0,01)
<i>Veillonella</i> spp.	0,48 (0,30)	1,32 (1,46)	0,59 (0,66)
<i>Arthrobacter</i> spp.	0,04 (0,08)	0,01 (0,02)	0 (0)
<i>Enterococcus</i> spp.	0,002 (0,004)	0,003 (0,006)	0 (0)
<i>Facklamia</i> spp.	0,01 (0,03)	0,003 (0,006)	0 (0)
<i>Klebsiella</i> spp.	0,23 (0,46)	0,02 (0,02)	0 (0)
<i>Leucobacter</i> spp.	0,03 (0,06)	0,00 (0,01)	0 (0)
<i>Leuconostoc</i> spp.	0,03 (0,07)	0,01 (0,02)	0 (0)
<i>Sphingomonas</i> spp.	0,06 (0,13)	0,05 (0,11)	0 (0)
<i>Aggregatibacter</i> spp.	0,06 (0,06)	0 (0)	0,05 (0,11)
<i>Anaerococcus</i> spp.	0,03 (0,06)	0 (0)	0,003 (0,008)
<i>Bacillus</i> spp.	0,03 (0,05)	0 (0)	0,003 (0,008)
<i>Chryseobacterium</i> spp.	0,11 (0,16)	0 (0)	0,01 (0,02)
<i>Clavibacter</i> spp.	0,01 (0,02)	0 (0)	0,01 (0,01)
<i>Dietzia</i> spp.	0,01 (0,02)	0 (0)	0,003 (0,008)
<i>Limmohabitans</i> spp.	0,003 (0,002)	0 (0)	0,006 (0,01)
<i>Moryella</i> spp.	0,002 (0,004)	0 (0)	0,003 (0,007)
<i>Paludibacter</i> spp.	0,02 (0,04)	0 (0)	0,003 (0,007)
<i>Parvimonas</i> spp.	0,03 (0,07)	0 (0)	0,01 (0,01)
<i>Arabidopsis</i> spp.	0,002 (0,004)	0 (0)	0 (0)
<i>Bdellovibrio</i> spp.	0,01 (0,02)	0 (0)	0 (0)
<i>Brachybacterium</i> spp.	0,03 (0,06)	0 (0)	0 (0)
<i>Candidatus Rhodoluna</i> spp.	0,03 (0,06)	0 (0)	0 (0)
<i>Delftia</i> spp.	0,02 (0,04)	0 (0)	0 (0)
<i>Enhydrobacter</i> spp.	0,03 (0,04)	0 (0)	0 (0)
<i>Fluviicola</i> spp.	0,02 (0,04)	0 (0)	0 (0)
<i>Hydrogenophilus</i> spp.	0,002 (0,004)	0 (0)	0 (0)
<i>Lactococcus</i> spp.	0,04 (0,08)	0 (0)	0 (0)
<i>Lysobacter</i> spp.	0,01 (0,02)	0 (0)	0 (0)
<i>Microbacterium</i> spp.	0,02 (0,05)	0 (0)	0 (0)

Quadro 7 – Porcentagem média e desvio-padrão de ocorrência dos gêneros nas amostras de biofilme dos bebês nos períodos de avaliação 12, 18 e 24 meses*

(conclusão)

Gêneros	Períodos experimentais		
	12 meses	18 meses	24 meses
<i>Micrococcus</i> spp.	0,02 (0,04)	0 (0)	0 (0)
<i>Paenibacillus</i> spp.	0,01 (0,02)	0 (0)	0 (0)
<i>Pedobacter</i> spp.	0,002 (0,004)	0 (0)	0 (0)
<i>Prostheobacter</i> spp.	0,004 (0,008)	0 (0)	0 (0)
<i>Renibacterium</i> spp.	0,02 (0,04)	0 (0)	0 (0)
<i>Rhodococcus</i> spp.	0,01 (0,02)	0 (0)	0 (0)
<i>Rhodoplanes</i> spp.	0,004 (0,008)	0 (0)	0 (0)
<i>Saprolegnia</i> spp.	0,004 (0,008)	0 (0)	0 (0)
<i>Sphingobacterium</i> spp.	0,002 (0,004)	0 (0)	0 (0)
<i>Sphingopyxis</i> spp.	0,002 (0,004)	0 (0)	0 (0)
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	0,03 (0,05)	0 (0)	0 (0)
<i>Weissella</i> spp.	0,01 (0,02)	0 (0)	0 (0)
<i>Zoogloea</i> spp.	0,002 (0,004)	0 (0)	0 (0)
<i>Zymomonas</i> spp.	0,002 (0,004)	0 (0)	0 (0)
<i>Selenomonas</i> spp.	0 (0)	0,01 (0,02)	0,08 (0,09)
<i>Vagococcus</i> spp.	0 (0)	0,004 (0,008)	0,003 (0,007)
<i>Atopobium</i> spp.	0 (0)	0,02 (0,04)	0 (0)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0 (0)	0,01 (0,02)	0 (0)
<i>Bulleidia</i> spp.	0 (0)	0,01 (0,02)	0 (0)
<i>Mogibacterium</i> spp.	0 (0)	0,02 (0,03)	0 (0)
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	0 (0)	0,003 (0,006)	0 (0)
<i>Rhodocytophaga</i> spp.	0 (0)	0,01 (0,01)	0 (0)
<i>Rubrobacter</i> spp.	0 (0)	0,003 (0,006)	0 (0)
<i>Saccharopolyspora</i> spp.	0 (0)	0,003 (0,006)	0 (0)
<i>Campylobacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,02 (0,02)
<i>Comamonas</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,003 (0,008)
<i>Gordonia</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,01)
<i>Phascolarctobacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,01)
<i>Tannerella</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,04 (0,07)
<i>Wolinella</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,01)

*Porcentagens mais relevantes em negrito.

Descrição da microbiota bucal das mães nos períodos experimentais

O objetivo da avaliação da microbiota dos responsáveis foi a análise paralela à microbiota do bebê. Assim, estes dados não foram analisados quanto à modificação de composição longitudinal intra-grupo.

Saliva

As percentagens médias representativas dos Filos detectados nas amostras de saliva dos responsáveis (SR), aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade do bebê, estão apresentadas na Figura 6. Observou-se a presença de 8 diferentes Filos, sendo Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, Spirochaetes, TM7 e SR1. Observou-se os Filos Cyanobacteria, Synergistetes e Tenericutes em percentagem reduzida.

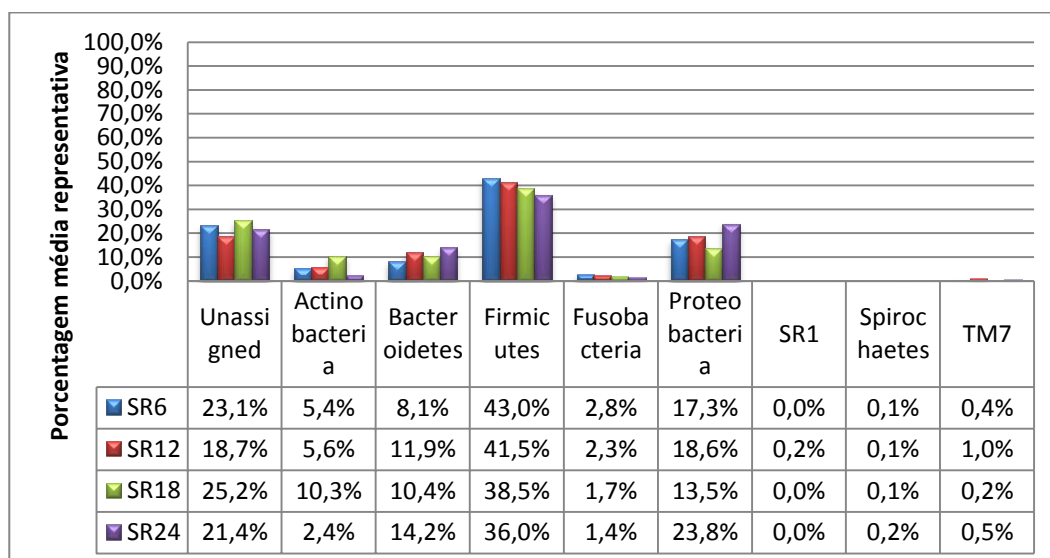


Figura 6 – Percentagens médias representativas de Filos detectadas nas amostras de saliva dos responsáveis aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade do bebê.

No Quadro 8 estão apresentados os gêneros detectados nas amostras de saliva dos responsáveis aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade do bebê. Os gêneros *Actinomyces* spp., *Rothia* spp., *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., [*Prevotella*] spp., *Gemella* spp., *Granulicatella* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Veillonella* spp., *Fusobacterium* spp., *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp. foram os gêneros mais representativos.

Quadro 8 – Porcentagem média e desvio-padrão de ocorrência dos gêneros nas amostras de saliva das mães nos períodos de avaliação 6, 12, 18 e 24 meses de vida dos bebês*

(continua)

Gêneros	Períodos experimentais			
	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
<i>Actinomyces</i> spp.	1,51 (0,62)	1,36 (0,99)	1,92 (1,83)	1,02 (1,12)
<i>Mobiluncus</i> spp.	0,006 (0,13)	0 (0)	0,004 (0,008)	0 (0)
<i>Corynebacterium</i> spp.	0,16 (0,17)	0 (0)	0,008 (1,59)	0,094 (0,10)
<i>Nesterenkonia</i> spp.	0,002 (0,004)	0 (0)	0,008 (0,01)	0,09 (0,01)
<i>Renibacterium</i> spp.	0,002 (0,004)	0 (0)	0,008 (0,02)	0 (0)
<i>Rothia</i> spp.	3,35 (1,89)	4,01 (2,12)	6,77 (5,29)	1,20 (0,96)
<i>Mycobacterium</i> spp.	0,002 (0,004)	0 (0)	0,008 (0,02)	0 (0)
<i>Propionibacterium</i> spp.	0,016 (0,08)	0 (0)	0,04 (0,90)	0 (0)
<i>Scardovia</i> spp.	0,02 (0,05)	0,01 (0,02)	0,03 (0,04)	0,01 (0,02)
<i>Atopobium</i> spp.	0,04 (0,04)	0,03 (0,06)	0,07 (0,05)	0,03 (0,05)
<i>Paludibacter</i> spp.	0,09 (0,14)	0,02 (0,03)	0,05 (0,07)	0,03 (0,11)
<i>Porphyromonas</i> spp.	1,62 (1,90)	1,90 (2,37)	0,92 (0,91)	2,12 (1,85)
<i>Tannerella</i> spp.	0,02 (0,08)	0,02 (0,02)	0,038 (0,05)	0,04 (0,09)
<i>Prevotella</i> spp.	5,73 (2,03)	7,08 (4,69)	7,56 (7,62)	10,19 (8,81)
[<i>Prevotella</i>] spp.	0,12 (0,10)	0,50 (0,40)	7,56 (7,62)	10,19 (8,81)
<i>Capnocytophaga</i> spp.	0,23 (0,18)	0,50 (0,40)	0,11 (0,10)	10,19 (8,81)
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,064 (0,08)	0,07 (0,12)	0,09 (0,08)	0,03 (0,03)
<i>Gemella</i> spp.	0,27 (0,59)	1,32 (1,92)	0,026 (0,02)	1,29 (2,04)
<i>Granulicatella</i> spp.	0,95 (0,75)	3,29 (2,94)	0,83 (0,79)	2,04 (2,80)
<i>Lactobacillus</i> spp.	0,03 (0,03)	0,01 (0,02)	0,04 (0,03)	0,01 (0,02)
<i>Streptococcus</i> spp.	13,16 (8,14)	11,93 (7,15)	15,39 (12,33)	10,56 (8,46)
<i>Blautia</i> spp.	0,008 (0,01)	0 (0)	0,004 (0,005)	0,004 (0,008)

Quadro 8 – Porcentagem média e desvio-padrão de ocorrência dos gêneros nas amostras de saliva das mães nos períodos de avaliação 6, 12, 18 e 24 meses de vida dos bebês*

(continuação)

Gêneros	Períodos experimentais			
	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
<i>Butyrivibrio</i> spp.	0,03 (0,06)	0,03 (0,03)	0,004 (0,008)	0,004 (0,008)
<i>Catonella</i> spp.	0,13 (0,12)	0,10 (0,09)	0,004 (0,008)	0,03 (0,03)
<i>Coprococcus</i> spp.	0,001 (0,02)	0 (0)	0,006 (0,01)	0 (0)
<i>Moryella</i> spp.	0,09 (0,06)	0,08 (0,05)	0,10 (0,12)	0,17 (0,23)
<i>Oribacterium</i> spp.	0,03 (0,04)	0,06 (0,07)	0,01 (0,01)	0,17 (0,23)
[<i>Ruminococcus</i>] spp.	0,06 (0,01)	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,02)
<i>Peptococcus</i> spp.	0,01 (0,02)	0 (0)	0,002 (0,004)	0,03 (0,06)
<i>Filifactor</i> spp.	0,02 (0,02)	0,11 (0,13)	0,03 (0,03)	0,05 (0,08)
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	0,01 (0,02)	0 (0)	0,002 (0,004)	0,03 (0,06)
<i>Dialister</i> spp.	0,004 (0,008)	0,01 (0,02)	0,02 (0,003)	0 (0)
<i>Megasphaera</i> spp.	0,05 (0,03)	0,23 (0,35)	0,03 (0,03)	0,08 (0,11)
<i>Phascolarctobacterium</i> spp.	0,06 (0,09)	0,06 (0,08)	0,08 (0,08)	0,08 (0,02)
<i>Schwartzia</i> spp.	0,02 (0,02)	0,01 (0,03)	0 (0)	0 (0)
<i>Selenomonas</i> spp.	0,35 (0,21)	0,01 (0,03)	0 (0)	0 (0)
<i>Veillonella</i> spp.	25,3 (15,67)	21,23 (19,6)	17,13 (17,5)	16,67 (15,66)
<i>Mogibacterium</i> spp.	0,02 (0,02)	0,03 (19,65)	0,03 (0,03)	0,02 (0,02)
<i>Parvimonas</i> spp.	0,05 (0,05)	0,08 (0,07)	0,03 (0,02)	0,05 (0,05)
<i>Bulleidia</i> spp.	0,02 (0,004)	0,02 (0,03)	0 (0)	0 (0)
<i>Fusobacterium</i> spp.	2,52 (1,34)	1,85 (1,57)	1,37 (0,60)	1,26 (1,14)
<i>Leptotrichia</i> spp.	0,23 (0,13)	0,46 (0,35)	0,34 (0,19)	0,11 (0,09)
<i>Burkholderia</i> spp.	0,02 (0,05)	0,01 (0,03)	0,07 (0,15)	0,07 (0,16)
<i>Lautropia</i> spp.	0,32 (0,56)	0,01 (0,03)	0,27 (0,54)	0,74 (1,58)
<i>Eikenella</i> spp.	0,01 (0,02)	0,01 (0,02)	0,006 (0,01)	0,01 (0,02)
<i>Kingella</i> spp.	0,08 (0,05)	0,03 (0,02)	0,05 (0,03)	0,06 (0,06)
<i>Neisseria</i> spp.	3,68 (6,01)	3,51 (4,45)	1,72 (1,76)	3,51 (3,88)
<i>Campylobacter</i> spp.	0,08 (0,09)	0,12 (0,05)	0,05 (0,02)	0,09 (0,14)
<i>Cardiobacterium</i> spp.	0,04 (0,03)	0,02 (0,03)	0,06 (0,06)	0,04 (0,03)
<i>Actinobacillus</i> spp.	0,19 (0,32)	0,08 (0,08)	0,18 (0,12)	0,04 (0,04)
<i>Aggregatibacter</i> spp.	0,02 (0,02)	0,05 (0,06)	0,03 (0,03)	0,17 (0,30)
<i>Haemophilus</i> spp.	11,78 (8,89)	6,60 (11,42)	8,41 (4,10)	17,22 (26,83)
<i>Enhydrobacter</i> spp.	0,002 (0,004)	0 (0)	0,004 (0,008)	0 (0)
<i>Moraxella</i> spp.	0,004 (0,008)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Pseudomonas</i> spp.	0,02 (0,02)	0 (0)	1,71 (3,82)	0,01 (0,02)
<i>Treponema</i> spp.	0,12 (0,11)	0,05 (0,06)	0,02 (0,03)	0,15 (0,14)

Quadro 8 – Porcentagem média e desvio-padrão de ocorrência dos gêneros nas amostras de saliva das mães nos períodos de avaliação 6, 12, 18 e 24 meses de vida dos bebês*

(continuação)

Gêneros	Períodos experimentais			
	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
<i>TG5</i> spp.	0,03 (0,02)	0,01 (0,02)	0,02 (0,03)	0,02 (0,03)
<i>Mycoplasma</i> spp.	0,02 (0,04)	0,01 (0,03)	0,008 (0,02)	0,01 (0,03)
<i>Shuttleworthia</i> spp.	0 (0)	0,01 (0,01)	0 (0)	0 (0)
<i>Anaerovorax</i> spp.	0 (0)	0,02 (0,02)	0 (0)	0 (0)
<i>Acinetobacter</i> spp.	0 (0)	0,01 (0,02)	0,06 (0,13)	0 (0)
<i>Acholeplasma</i> spp.	0 (0)	0,01 (0,01)	0 (0)	0 (0)
<i>Actinobaculum</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)	0 (0)
<i>Corynebacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,09 (1,59)	0 (0)
<i>Janibacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Terracoccus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Candidatus Rhodoluna</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)	0 (0)
<i>Clavibacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,02)	0 (0)
<i>Microbacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,02 (0,04)	0 (0)
<i>Salinibacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Arthrobacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Micrococcus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Rhodococcus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Williamsia</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Alloscardovia</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,02)	0,004 (0,008)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0,004 (0,008)
<i>Rubrobacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,008 (0,02)	0 (0)
<i>Bacteroides</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)	0 (0)
<i>Flectobacillus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)	0 (0)
<i>Fluviicola</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Flavobacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,09 (0,21)	0 (0)
<i>Chryseobacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,04 (0,08)	0 (0)
<i>Cloacibacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,034 (0,08)	0 (0)
<i>Ornithobacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Pedobacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)	0 (0)
<i>Sphingobacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)	0 (0)
<i>Bacillus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,02)	0 (0)
<i>Geobacillus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,02)	0 (0)
<i>Alloiococcus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)	0 (0)
<i>Trichococcus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,006 (0,01)	0 (0)

Quadro 8 – Porcentagem média e desvio-padrão de ocorrência dos gêneros nas amostras de saliva das mães nos períodos de avaliação 6, 12, 18 e 24 meses de vida dos bebês*

(continuação)

Gêneros	Períodos experimentais			
	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
<i>Clostridium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)	0,004 (0,008)
<i>Pseudoramibacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Coprococcus</i> spp.	0,01 (0,02)	0 (0)	0,006 (0,01)	0 (0)
<i>Faecalibacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Syntrophomonas</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,08 (0,01)	0 (0)
<i>Gemmata</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Phenylobacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,008 (0,02)	0 (0)
<i>Bosea</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,03 (0,06)	0 (0)
<i>Pleomorphomonas</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Xanthobacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Paracoccus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Rhodobacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Novosphingobium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Sphingomonas</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,02)	0 (0)
<i>Comamonas</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,02)	0 (0)
<i>Delftia</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Limnohabitans</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Methylibium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Janthinobacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,006 (0,01)	0 (0)
<i>Polynucleobacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)	0 (0)
<i>Ralstonia</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,02 (0,05)	0 (0)
<i>Uliginosibacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Zoogloea</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Wolinella</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Cellvibrio</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Klebsiella</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,02)	0 (0)
<i>Morganella</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Raoultella</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)
<i>Legionella</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)	0 (0)
<i>Prostheobacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,02)	0 (0)
<i>Alloscardovia</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,009)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,03)
<i>Blvii28</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,03)
<i>Aerococcus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,03)

Quadro 8 – Porcentagem média e desvio-padrão de ocorrência dos gêneros nas amostras de saliva das mães nos períodos de avaliação 6, 12, 18 e 24 meses de vida dos bebês*

(conclusão)

Gêneros	Períodos experimentais			
	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
<i>Facklamia</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,03)
<i>Clostridium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)
<i>Anaerovorax</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,02)
<i>Desulfobulbus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)

*Porcentagens mais relevantes em negrito.

Biofilme

Na figura 7, podemos observar as porcentagens médias representativas de Filos presentes nos biofilmes das mães (BR), aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade do bebê. Observou-se a presença de 11 diferentes Filos: Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, SR1, Spirochaetes, TM7, Cyanobacteria, Chlorobi e Verrucomicrobia. Ainda, observou-se os Filos Acidobacteria, Chlamydiae, Planctomycetes, Tenericutes, Synergistetes em porcentagens muito reduzidas.

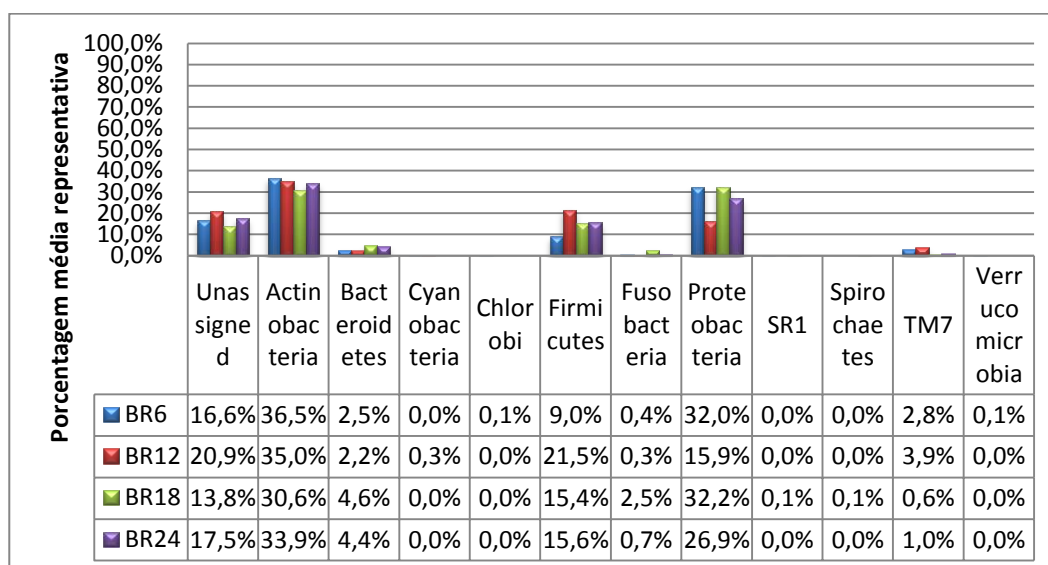


Figura 7 – Porcentagens médias representativas de Filos detectadas nas amostras de biofilmes dos responsáveis, aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade do bebê.

No Quadro 9 estão apresentados os gêneros detectados nas amostras de biofilme dos responsáveis aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade do bebê. Os gêneros *Actinomyces* spp., *Corynebacterium* spp., *Rothia* spp., *Propionibacterium* spp., *Prevotella* spp., *Granulicatella* spp., *Porphyromonas* spp., *Streptococcus* spp., *Veillonella* spp., *Pseudomonas* spp., *Burkholderia* spp., *Lautropia* spp., *Fusobacterium* spp., *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp. foram os gêneros mais representativos.

Quadro 9 – Porcentagem média e desvio-padrão de ocorrência dos gêneros nas amostras de biofilme das mães nos períodos de avaliação 12, 18 e 24 meses de vida dos bebês*

(continua)

Gêneros	Períodos experimentais			
	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
<i>Actinobaculum</i> spp.	0,01 (0,03)	0,028 (0,05)	0 (0)	0,004 (0,008)
<i>Actinomyces</i> spp.	8,45 (8,94)	3,38 (3,65)	4,39 (7,09)	5,97 (5,65)
<i>Corynebacterium</i> spp.	6,26 (10,85)	8,70 (12,0)	10,78 (15,98)	8,56 (9,02)
<i>Brachybacterium</i> spp.	0,004 (0,008)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Candidatus Rhodoluna</i> spp.	0,19 (0,34)	0,02 (0,05)	0 (0)	0,06 (0,12)
<i>Clavibacter</i> spp.	0,01 (0,35)	0,05 (0,12)	0,004 (0,008)	0,006 (0,10)
<i>Microbacterium</i> spp.	0,07 (0,15)	0,05 (0,11)	0 (0)	0,004 (0,008)
<i>Arthrobacter</i> spp.	0,004 (0,008)	0,008 (0,01)	0 (0)	0,004 (0,008)
<i>Micrococcus</i> spp.	0,006 (0,01)	0,008 (0,01)	0,02 (0,03)	0,01 (0,03)
<i>Nesterenkonia</i> spp.	0,006 (0,01)	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,01)
<i>Renibacterium</i> spp.	0,06 (0,11)	0 (0)	0 (0)	0,03 (0,04)
<i>Rothia</i> spp.	19,71 (29,23)	19,15 (33,36)	15,05 (13,99)	17,91 (22,37)
<i>Mycobacterium</i> spp.	0,11 (0,14)	0,03 (0,05)	0,03 (0,06)	0,04 (0,09)
<i>Rhodococcus</i> spp.	0,03 (0,06)	0,03 (0,07)	0 (0)	0 (0)
<i>Propionibacterium</i> spp.	1,07 (1,41)	3,32 (7,20)	0,13 (0,16)	0,73 (1,15)
<i>Williamsia</i> spp.	0,03 (0,06)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Paludibacter</i> spp.	0,01 (0,01)	0,04 (0,08)	0,07 (0,14)	0,02 (0,05)
<i>Porphyromonas</i> spp.	0,11 (0,10)	0,41 (0,37)	1,14 (1,65)	0,49 (0,71)
<i>Prevotella</i> spp.	0,54 (0,62)	0,20 (0,35)	8,43 (17,93)	0,88 (0,93)
<i>Blvii28</i> spp.	0,01 (0,02)	0,02 (0,05)	0 (0)	0 (0)
[<i>Prevotella</i>] spp.	0,03 (0,03)	0,11 (0,10)	0,73 (0,97)	0,95 (2,04)
<i>Flectobacillus</i> spp.	0,03 (0,05)	0,03 (0,07)	0 (0)	0 (0)

Quadro 9 – Porcentagem média e desvio-padrão de ocorrência dos gêneros nas amostras de biofilme das mães nos períodos de avaliação 12, 18 e 24 meses de vida dos bebês*

(continuação)

Gêneros	Períodos experimentais			
	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
<i>Pontibacter</i> spp.	0,008 (0,02)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Capnocytophaga</i> spp.	0,09 (0,15)	0,08 (0,08)	0,72 (0,81)	0,62 (0,69)
<i>Flavobacterium</i> spp.	0,66 (1,25)	0,47 (1,05)	0,03 (0,04)	0,26 (0,57)
<i>Cloacibacterium</i> spp.	0,07 (0,15)	0,06 (0,14)	0,09 (0,18)	0,19 (0,43)
<i>Wautersiella</i> spp.	0,006 (0,01)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Pedobacter</i> spp.	0,03 (0,04)	0,07 (0,16)	0,004 (0,008)	0,05 (0,11)
<i>BacteSphingobacterium</i> spp.	0,03 (0,06)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Sediminibacterium</i> spp.	0,01 (0,03)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Alicyclobacillus</i> spp.	0,004 (0,008)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Bacillus</i> spp.	0,004 (0,008)	0 (0)	0,02 (0,04)	0,08 (0,16)
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,04 (0,05)	0,14 (0,25)	0,01 (0,02)	0,06 (0,05)
<i>Gemella</i> spp.	0,17 (0,37)	0,62 (1,23)	0,49 (0,83)	0,09 (0,14)
<i>Granulicatella</i> spp.	1,07 (2,28)	0,65 (0,68)	1,14 (1,24)	0,96 (1,09)
<i>Trichococcus</i> spp.	0,03 (0,06)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Lactobacillus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	(0,02)
<i>Leuconostoc</i> spp.	0	0,002 (0,004)	0 (0)	0,02 (0,04)
<i>Lactococcus</i> spp.	0,06 (0,06)	0 (0)	0,004 (0,008)	0 (0)
<i>Streptococcus</i> spp.	5,91 (8,11)	16,27 (18,41)	9,76 (10,95)	8,95 (7,87)
<i>Blautia</i> spp.	0,006 (0,001)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Shuttleworthia</i> spp.	0,01 (0,02)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Peptococcus</i> spp.	0,05 (0,12)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Selenomonas</i> spp.	0,07 (0,14)	0,01 (0,04)	0,09 (0,18)	0,20 (0,53)
<i>Veillonella</i> spp.	0,68 (1,12)	0,49 (0,51)	1,82 (1,73)	2,78 (5,48)
<i>Anaerovorax</i> spp.	0,04 (0,07)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Anaerococcus</i> spp.	0,062 (0,13)	0 (0)	0 (0)	0,006 (0,01)
<i>Parvimonas</i> spp.	0,008 (0,02)	0,004 (0,008)	0,03 (0,06)	0,004 (0,05)
<i>Fusobacterium</i> spp.	0,30 (0,25)	0,25 (0,35)	1,89 (3,89)	0,46 (0,36)
<i>Leptotrichia</i> spp.	0,06 (0,08)	0,08 (0,13)	0,63 (0,63)	0,21 (0,27)
<i>Phenylobacterium</i> spp.	0,008 (0,01)	0 (0)	0 (0)	0,04 (0,08)
<i>Bosea</i> spp.	0,28 (0,62)	0,09 (0,14)	0,04 (0,07)	0,21 (0,34)
<i>chrobactrum</i> spp.	0,004 (0,009)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Devosia</i> spp.	0,004 (0,009)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Rhodobacter</i> spp.	0,03 (0,06)	0 (0)	0,004 (0,008)	0 (0)
<i>Novosphingobium</i> spp.	0,01 (0,03)	0,02 (0,04)	0 (0)	0 (0)

Quadro 9 – Porcentagem média e desvio-padrão de ocorrência dos gêneros nas amostras de biofilme das mães nos períodos de avaliação 12, 18 e 24 meses de vida dos bebês*

(continuação)

Gêneros	Períodos experimentais			
	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
<i>Sphingomonas</i> spp.	0,10 (0,09)	0,02 (0,03)	0,38 (0,58)	0,13 (0,12)
<i>Burkholderia</i> spp.	10,92 (22,25)	2,12 (4,44)	24,24 (35,45)	9,42 (14,48)
<i>Lautropia</i> spp.	2,64 (5,75)	1,82 (3,04)	0,44 (0,44)	3,22 (6,89)
<i>Delftia</i> spp.	0,006 (0,01)	0,02 (0,03)	0 (0)	0 (0)
<i>Limnohabitans</i> spp.	0,01 (0,03)	0,008 (0,02)	0 (0)	0 (0)
<i>Methylibium</i> spp.	0,01 (0,03)	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)
<i>Polaromonas</i> spp.	0,01 (0,03)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Janthinobacterium</i> spp.	0,05 (0,09)	0,02 (0,04)	0 (0)	0,008 (0,02)
<i>Ralstonia</i> spp.	0,04 (0,05)	0,10 (0,23)	0,12 (0,16)	0,11 (0,25)
<i>Kingella</i> spp.	0,02 (0,03)	0,002 (0,004)	0,44 (0,84)	0,04 (0,04)
<i>Neisseria</i> spp.	0,35 (0,33)	2,94 (5,59)	0,88 (1,06)	1,48 (2,00)
<i>Uliginosibacterium</i> spp.	0,01 (0,03)	0,008 (0,02)	0 (0)	0 (0)
<i>Zoogloea</i> spp.	0,004 (0,008)	0 (0)	0 (0)	0,008 (0,02)
<i>Rheinheimera</i> spp.	0,01 (0,03)	0,002 (0,004)	0 (0)	0 (0)
<i>Cardiobacterium</i> spp.	0,02 (0,02)	0,02 (0,02)	0,21 (0,23)	0,13 (0,18)
<i>Klebsiella</i> spp.	0 (0)	0,02 (0,04)	0 (0)	0,01 (0,02)
<i>Actinobacillus</i> spp.	0,02 (0,03)	0,08 (0,14)	0,20 (0,44)	0,07 (0,06)
<i>Haemophilus</i> spp.	0,32 (0,18)	0 (0)	2,74 (5,01)	1,79 (2,15)
<i>Acinetobacter</i> spp.	0,19 (0,37)	0,24 (0,50)	0,08 (0,17)	0,37 (0,76)
<i>Enhydrobacter</i> spp.	0,06 (0,02)	0,03 (0,05)	0,004 (0,008)	0 (0)
<i>Perlucidibaca</i> spp.	0,03 (0,06)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Pseudomonas</i> spp.	13,49 (22,83)	4,72 (9,22)	0,67 (1,28)	7,82 (17,13)
<i>Treponema</i> spp.	0,004 (0,008)	0 (0)	0,03 (0,06)	0 (0)
TG5 spp.	0,03 (0,05)	0 (0)	0,03 (0,06)	0 (0)
<i>Prostheco bacter</i> spp.	0,06 (0,06)	0,02 (0,04)	0 (0)	0 (0)
<i>Candidatus</i> <i>Xiphinematobacter</i> spp.	0,01 (0,02)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Iamia</i> spp.	0 (0)	0,002 (0,004)	0 (0)	0 (0)
<i>Brevibacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,02 (0,04)	0 (0)
<i>Geodermatophilus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)	0 (0)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,008 (0,02)	0 (0)
<i>Rubrobacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,04 (0,08)	0 (0)
<i>Bacteroides</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,02 (0,04)	0,02 (0,05)
<i>Fluviicola</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)	0 (0)

Quadro 9 – Porcentagem média e desvio-padrão de ocorrência dos gêneros nas amostras de biofilme das mães nos períodos de avaliação 12, 18 e 24 meses de vida dos bebês*

(continuação)

Gêneros	Períodos experimentais			
	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
<i>Chryseobacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,02 (0,03)	0 (0)
<i>Vagococcus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)	0,01 (0,02)
<i>Turicibacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)
<i>Catonella</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)	0,004 (0,008)
<i>Moryella</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,03 (0,05)	0,004 (0,008)
<i>Peptococcus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,04 (0,04)	0 (0)
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,008 (0,02)	0 (0)
<i>Ruminococcus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,02 (0,04)	0,07 (0,15)
<i>Megasphaera</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,04 (0,08)	0,07 (0,15)
<i>Mogibacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)	0 (0)
<i>Pleomorphomonas</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,008 (0,02)	0 (0)
<i>Paracoccus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,08 (0,02)	0 (0)
<i>Sphingobium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,04 (0,02)	0,01 (0,02)
<i>Hydrogenophilus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,008 (0,02)	0 (0)
<i>Bdellovibrio</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)	0 (0)
<i>Campylobacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,05 (0,08)	0 (0)
<i>Nevskia</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,02 (0,04)	0 (0)
<i>Mycoplasma</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0,04 (0,08)	0,01 (0,03)
<i>Janibacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,02 (0,04)
<i>Terracoccus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,03)
<i>Leucobacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,02 (0,05)
<i>Salinibacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,08 (0,18)
<i>Atopobium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,008 (0,01)
<i>Tannerella</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)
<i>Runella</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,02 (0,05)
<i>Chryseobacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,19 (0,43)
<i>Ornithobacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,02 (0,04)
<i>Sphingobacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)
<i>Alloiococcus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,008 (0,02)
<i>Carnobacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,008 (0,02)
<i>Clostridium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,03 (0,05)
<i>Faecalibacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,02 (0,05)
<i>Phascolarctobacterium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,02 (0,05)

Quadro 9 – Porcentagem média e desvio-padrão de ocorrência dos gêneros nas amostras de biofilme das mães nos períodos de avaliação 12, 18 e 24 meses de vida dos bebês*

(conclusão)

Gêneros	Períodos experimentais			
	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
<i>Gemmata</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,008 (0,02)
<i>Asticcacaulis</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,008 (0,02)
<i>Hyphomicrobium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,008 (0,02)
<i>Comamonas</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,05 (0,11)
<i>Polynucleobacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,02 (0,05)
<i>Methylotenera</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)
<i>Eikenella</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,008)
<i>Campylobacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,02 (0,05)
<i>Morganella</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,004 (0,009)
<i>Aggregatibacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,03 (0,05)
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,06 (0,06)
<i>Luteolibacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,008 (0,018)

*Porcentagens mais relevantes em negrito.

Sobreposição dos dados de diversidade obtidos para bebês e mães

Saliva/ Filos

As porcentagens médias representativas dos Filos presentes nas amostras de saliva dos bebês e das mães aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade do bebê, estão apresentadas no Quadro 10.

Observa-se que os Filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, SR1 e TM7 foram comuns nas microbiotas da saliva dos bebês e mães. Maior ocorrência porcentual em ambas as populações estudada foi de Firmicutes, seguida por Proteobacteria e Bacteroidetes. O Filo Spirochaetes foi observado em

baixa ocorrência porcentual entre as mães, porém não foi detectado em níveis significativos nos bebês em todos os períodos de avaliação.

Quadro 10 – Distribuição porcentual dos Filos presentes nas amostras de saliva dos bebês e suas mães nos períodos de avaliação

População	Período experimental/ Filos/ (%)			
	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
	Actinobacteria			
Bebês	1,9	0,9	3,8	7,5
Mães	5,4	5,6	10,3	2,4
	Bacteroidetes			
Bebês	7,1	14,2	9,8	12
Mães	8,1	11,9	10,4	14,2
	Firmicutes			
Bebês	72,2	56,5	48,1	44
Mães	43	41,5	38,5	36
	Fusobacteria			
Bebês	0,4	2,2	2,1	1,5
Mães	2,8	2,3	1,7	1,4
	Proteobacteria			
Bebês	1,2	6,4	11,6	13,2
Mães	17,3	18,6	13,5	23,8
	SR1			
Bebês	0	0	0	0,1
Mães	0	0,2	0	0
	Spirochaetes			
Bebês	0	0	0	0
Mães	0,1	0,1	0,1	0,2
	TM7			
Bebês	0,4	0,2	3,6	0,5
Mães	0,4	1	0,2	0,5

Saliva/ Gêneros

Aos 6 meses de idade do bebê, observou-se que grande porcentagem dos gêneros presentes na população de bebês esteve presente também nas mães. Vinte e nove gêneros foram coincidentes entre mães e bebês. Dos 30 gêneros detectados nos bebês, apenas 1

não foi encontrado em suas mães. A saliva das mães apresentou 29 gêneros que não foram detectados nos bebês (Figura 8).

Aos 12 meses de idade, observou-se também que grande porcentagem dos gêneros presentes nos bebês está presente nas mães. Trinta e sete gêneros são comuns aos grupos estudados. Apenas 7 gêneros diferentes estavam presentes a mais na microbiota dos bebês. Nas mães este número foi de 19 (Figura 9).

Aos 18 meses de idade, observou-se o mesmo relatado para 6 e 12 meses, sendo que 41 gêneros foram comuns aos grupos. Apenas 4 gêneros eram diferentes no bebês em relação às mães. Uma diversidade maior e diferente foi observada na saliva das mães, já que 74 gêneros eram específicas das mesmas (Figura 10).

Aos 24 meses de idade, também observou-se que grande porcentagem dos gêneros eram comum aos grupos (33 gêneros em comum). Sendo que, apenas 7 gêneros eram específicos dos bebês (Figura 11).

<i>Pedobacter</i> spp.	<i>[Prevotella]</i> spp. <i>Actinobacillus</i> spp. <i>Actinomyces</i> spp. <i>Aggregatibacter</i> spp. <i>Burkholderia</i> spp. <i>Campylobacter</i> spp. <i>Capnocytophaga</i> spp. <i>Coprococcus</i> spp. <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Gemella</i> spp. <i>Granulicatella</i> spp. <i>Haemophilus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Lautropia</i> spp. <i>Leptotrichia</i> spp. <i>Moryella</i> spp. <i>Neisseria</i> spp. <i>Oribacterium</i> spp. <i>Phascolarctobacterium</i> spp. <i>Porphyromonas</i> spp. <i>Prevotella</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Rothia</i> spp. <i>Selenomonas</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Treponema</i> spp. <i>Veillonella</i> spp.	<i>[Ruminococcus]</i> spp. <i>Atopobium</i> spp. <i>Blautia</i> spp. <i>Bulleidia</i> spp. <i>Butyrivibrio</i> spp. <i>Cardiobacterium</i> spp. <i>Catonella</i> spp. <i>Dialister</i> spp. <i>Eikenella</i> spp. <i>Enhydrobacter</i> spp. <i>Filifactor</i> spp. <i>Kingella</i> spp. <i>Megasphaera</i> spp. <i>Mobiluncus</i> spp. <i>Mogibacterium</i> spp. <i>Moraxella</i> spp. <i>Mycobacterium</i> spp. <i>Mycoplasma</i> spp. <i>Nesterenkonia</i> spp. <i>Paludibacter</i> spp. <i>Parvimonas</i> spp. <i>Peptococcus</i> spp. <i>Peptostreptococcus</i> spp. <i>Propionibacterium</i> spp. <i>Renibacterium</i> spp. <i>Scardovia</i> spp. <i>Schwartzia</i> spp. <i>Tannerella</i> spp. <i>TG5</i> spp.
------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

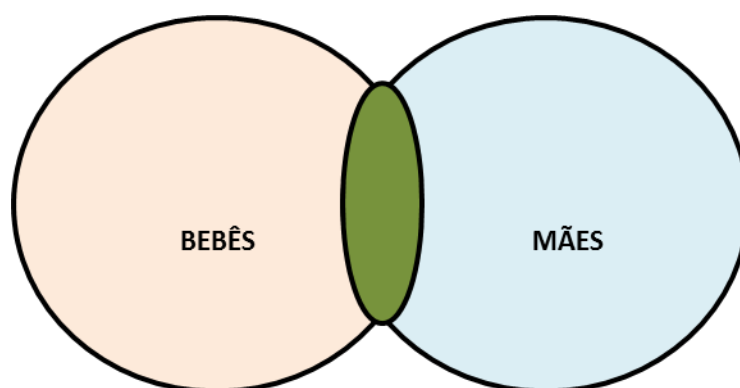


Figura 8 – Diagrama de Venn para representação dos gêneros presentes na saliva dos bebês e suas mães, aos 6 meses de idade do bebê. A porção verde do diagrama apresenta os gêneros coincidentes nas duas populações.

<p><i>Chryseobacterium</i> spp. <i>Facklamia</i> spp. <i>Microbacterium</i> spp. <i>Moraxella</i> spp. <i>Peptostreptococcus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Syntrophomonas</i> spp.</p>	<p><i>[Prevotella]</i> spp. <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Actinobacillus</i> spp. <i>Actinomyces</i> spp. <i>Aggregatibacter</i> spp. <i>Atopobium</i> spp. <i>Burkholderia</i> spp. <i>Campylobacter</i> spp. <i>Capnocytophaga</i> spp. <i>Cardiobacterium</i> spp. <i>Catonella</i> spp. <i>Coprococcus</i> spp. <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Eikenella</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Gemella</i> spp. <i>Granulicatella</i> spp. <i>Haemophilus</i> spp. <i>Kingella</i> spp. <i>Lautropia</i> spp. <i>Leptotrichia</i> spp. <i>Megasphaera</i> spp. <i>Mogibacterium</i> spp. <i>Neisseria</i> spp. <i>Oribacterium</i> spp. <i>Peptococcus</i> spp. <i>Phascolarctobacterium</i> spp. <i>Porphyromonas</i> spp. <i>Prevotella</i> spp. <i>Rothia</i> spp. <i>Scardovia</i> spp. <i>Selenomonas</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Tannerella</i> spp. <i>Vagococcus</i> spp. <i>Veillonella</i> spp.</p>	<p><i>Abiotrophia</i> spp. <i>Acholeplasma</i> spp. <i>Anaerovorax</i> spp. <i>Bulleidia</i> spp. <i>Butyrivibrio</i> spp. <i>Dialister</i> spp. <i>Filifactor</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Megamonas</i> spp. <i>Mobiluncus</i> spp. <i>Moryella</i> spp. <i>Mycoplasma</i> spp. <i>Paludibacter</i> spp. <i>Parvimonas</i> spp. <i>Pseudoramibacter_Eubacterium</i> spp. <i>Schwartzia</i> spp. <i>Shuttleworthia</i> spp. <i>TG5</i> spp. <i>Treponema</i> spp.</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

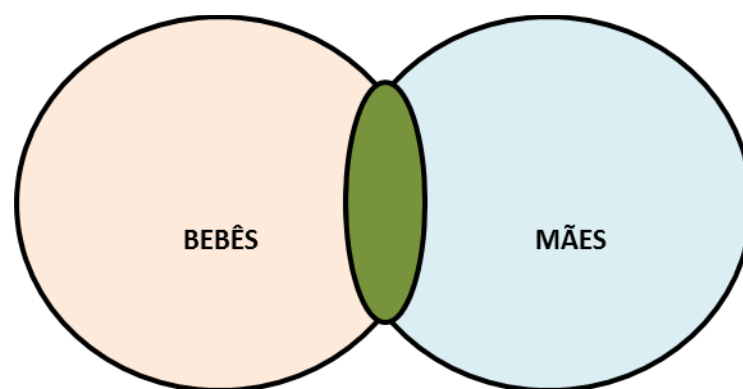


Figura 9 – Diagrama de Venn para representação dos gêneros presentes na saliva dos bebês e suas mães, aos 12 meses de idade do bebê. A porção verde do diagrama apresenta os gêneros coincidentes nas duas populações.

<p>[<i>Ruminococcus</i>] spp. <i>Conchiformibius</i> spp. <i>Moraxella</i> spp. <i>Moryella</i> spp.</p>	<p>[<i>Prevotella</i>] spp. <i>Actinobacillus</i> spp. <i>Actinomyces</i> spp. <i>Aggregatibacter</i> spp. <i>Alloiooccus</i> spp. <i>Atopobium</i> spp. <i>Burkholderia</i> spp. <i>Campylobacter</i> spp. <i>Capnocytophaga</i> spp. <i>Cardiobacterium</i> spp. <i>Catonella</i> spp. <i>Coprococcus</i> spp. <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Eikenella</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Gemella</i> spp. <i>Granulicatella</i> spp. <i>Haemophilus</i> spp. <i>Kingella</i> spp. <i>Lautropia</i> spp. <i>Leptotrichia</i> spp. <i>Megasphaera</i> spp. <i>Mogibacterium</i> spp. <i>Neisseria</i> spp. <i>Nesterenkonia</i> spp. <i>Oribacterium</i> spp. <i>Peptococcus</i> spp. <i>Phascolarctobacterium</i> spp. <i>Porphyromonas</i> spp. <i>Prevotella</i> spp. <i>Propionibacterium</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Rothia</i> spp. <i>Selenomonas</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Stenotrophomonas</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Syntrophomonas</i> spp. TG5 spp. <i>Treponema</i> spp. <i>Veillonella</i> spp.</p>	<p><i>Acinetobacter</i> spp. <i>Actinobaculum</i> spp. <i>Allocardovia</i> spp. <i>Arthrobacter</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Bacteroides</i> spp. <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Blautia</i> spp. <i>Bosea</i> spp. <i>Butyrivibrio</i> spp. <i>Candidatus Rhabdochlamydia</i> spp. <i>Candidatus Rhodoluna</i> spp. <i>Cellvibrio</i> spp. <i>Chryseobacterium</i> spp. <i>Clavibacter</i> spp. <i>Cloacibacterium</i> spp. <i>Clostridium</i> spp. <i>Comamonas</i> spp. <i>Delftia</i> spp. <i>Dialister</i> spp. <i>Enhydrobacter</i> spp. <i>Faecalibacterium</i> spp. <i>Filifactor</i> spp. <i>Flavobacterium</i> spp. <i>Flectobacillus</i> spp. <i>Fluviicola</i> spp. <i>Gemmata</i> spp. <i>Geobacillus</i> spp. <i>Janibacter</i> spp. <i>Janthinobacterium</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Legionella</i> spp. <i>Limnohabitans</i> spp. <i>Methylibium</i> spp. <i>Microbacterium</i> spp. <i>Micrococcus</i> spp.</p>	<p><i>Mobiluncus</i> spp. <i>Morganella</i> spp. <i>Moryella</i> spp. <i>Mycobacterium</i> spp. <i>Mycoplasma</i> spp. <i>Novosphingobium</i> spp. <i>Omithobacterium</i> spp. <i>Paludibacter</i> spp. <i>Paracoccus</i> spp. <i>Parvimonas</i> spp. <i>Pedobacter</i> spp. <i>Peptostreptococcus</i> spp. <i>Perlucidibaca</i> spp. <i>Phenylobacterium</i> spp. <i>Pleomorphomonas</i> spp. <i>Polynucleobacter</i> spp. <i>Prostheobacter</i> spp. <i>Pseudoramibacter_Eubacterium</i> spp. <i>Ralstonia</i> spp. <i>Raoultella</i> spp. <i>Renibacterium</i> spp. <i>Rhodobacter</i> spp. <i>Rhodococcus</i> spp. <i>Rubrobacter</i> spp. <i>Salinibacterium</i> spp. <i>Scardovia</i> spp. <i>Sphingobacterium</i> spp. <i>Sphingobium</i> spp. <i>Sphingomonas</i> spp. <i>Tannerella</i> spp. <i>Terracoccus</i> spp. <i>Trichococcus</i> spp. <i>Uliginosibacterium</i> spp. <i>Williamsia</i> spp. <i>Wolinella</i> spp. <i>Xanthobacter</i> spp. <i>Zoogloea</i> spp.</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

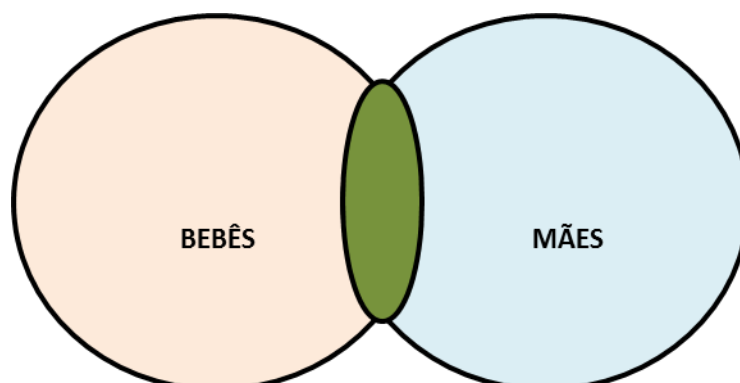


Figura 10 – Diagrama de Venn para representação dos gêneros presentes na saliva dos bebês e suas mães, aos 18 meses de idade do bebê. A porção verde do diagrama apresenta os gêneros coincidentes nas duas populações.

<p><i>Abiotrophia</i> spp. <i>Alloiococcus</i> spp. <i>Coprococcus</i> spp. <i>Janthinobacterium</i> spp. <i>Propionibacterium</i> spp. <i>Sphingomonas</i> spp. <i>Vagococcus</i> spp.</p>	<p><i>[Prevotella]</i> spp. <i>[Ruminococcus]</i> spp. <i>Actinobacillus</i> spp. <i>Actinomyces</i> spp. <i>Aggregatibacter</i> spp. <i>Burkholderia</i> spp. <i>Capnocytophaga</i> spp. <i>Cardiobacterium</i> spp. <i>Catonella</i> spp. <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Eikenella</i> spp. <i>Facklamia</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Gemella</i> spp. <i>Granulicatella</i> spp. <i>Haemophilus</i> spp. <i>Kingella</i> spp. <i>Lautropia</i> spp. <i>Leptotrichia</i> spp. <i>Mogibacterium</i> spp. <i>Moryella</i> spp. <i>Neisseria</i> spp. <i>Oribacterium</i> spp. <i>Parvimonas</i> spp. <i>Peptostreptococcus</i> spp. <i>Phascolarctobacterium</i> spp. <i>Porphyromonas</i> spp. <i>Prevotella</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Rothia</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Veillonella</i> spp.</p>	<p><i>Aerococcus</i> spp. <i>Alloscardovia</i> spp. <i>Anaerovorax</i> spp. <i>Atopobium</i> spp. <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Blautia</i> spp. <i>Blvi28</i> spp. <i>Butyrivibrio</i> spp. <i>Campylobacter</i> spp. <i>Clostridium</i> spp. <i>Desulfobulbus</i> spp. <i>Filifactor</i> spp. <i>KD1-23</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Megasphaera</i> spp. <i>Mycoplasma</i> spp. <i>Paludibacter</i> spp. <i>Peptococcus</i> spp. <i>Scardovia</i> spp. <i>Selenomonas</i> spp. <i>Tannerella</i> spp. <i>TG5</i> spp. <i>Treponema</i> spp.</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

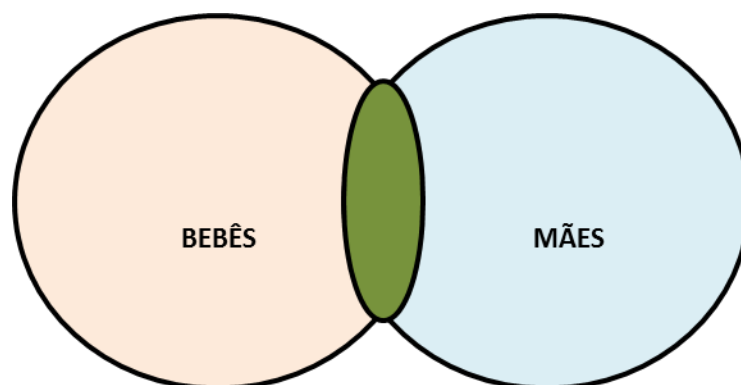


Figura 11 – Diagrama de Venn para representação dos gêneros presentes na saliva dos bebês e suas mães, aos 24 meses de idade do bebê. A porção verde do diagrama apresenta os gêneros coincidentes nas duas populações.

Biofilme/ Filos

O Quadro 11 apresenta a distribuição percentual dos Filos presentes nas amostras de biofilme de bebês e dos responsáveis aos 12, 18 e 24 meses de idade do bebê. À semelhança do observado na saliva, observa-se a presença nas duas populações dos Filos Actinobacteria, Bacteroides, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria e TM7 e SR1. Os Filos Spirochaetes e SR1 foram observados apenas nas mães na avaliação aos 18 meses do bebê, porém não foram detectados nas amostras de biofilme dos bebês no mesmo período.

Maior ocorrência dos Filos Firmicutes, seguido por Proteobacteria e Actinobacteria foi observada.

Quadro 11 – Distribuição percentual dos Filos presentes nas amostras de biofilme dos bebês e suas mães nos períodos de avaliação

População	Período experimental/ Filos/ (%)		
	12 meses	18 meses	24 meses
	Actinobacteria		
Bebês	7,5	21,2	24,8
Mães	35	30,6	33,9
	Bacteroidetes		
Bebês	4,2	9,1	15
Mães	2,2	4,6	4,4
	Firmicutes		
Bebês	52,5	39,2	25,2
Mães	21,5	15,4	15,6
	Fusobacteria		
Bebês	0,7	1,1	1,1
Mães	0,3	2,5	0,7
	Proteobacteria		
Bebês	17,2	7,2	9,7
Mães	15,9	32,2	26,9
	SR1		
Bebês	0,05	0	0,1
Mães	0	0,1	0
	Spirochaetes		
Bebês	0	0	0
Mães	0	0,1	0
	TM7		
Bebês	0,1	0,6	2,2
Mães	3,9	0,6	1,0

Biofilme/ Gêneros

Aos 12 meses de idade, observou-se que grande porcentagem dos gêneros presentes na população de bebês estava presente também nas mães. Cinquenta gêneros foram coincidentes entre mães e bebês. Dos 77 gêneros detectados nos bebês, vinte e sete não foram encontrados em suas mães. A saliva das mães apresentou 27 gêneros que não foram detectados nos bebês (Figura 12).

Aos 18 meses de idade, observa-se menor diversidade de gêneros quando comparado aos 6 meses. Observou-se a presença de 38 gêneros em comum aos grupos. Dos cinquenta gêneros detectados nos bebês, apenas 14 não foram encontrados em suas mães. A saliva das mães apresentou 29 gêneros que não foram detectados nos bebês (Figura 13).

Aos 24 meses de idade, observou-se o mesmo relatado aos 12 e 18 meses de idade do bebê. Sendo que, 47 gêneros eram comuns aos grupos e apenas 6 gêneros eram específicos dos bebês. Enquanto a diversidade das mães apresentou-se elevada, com 43 gêneros específicos (Figura 14).

<i>Abiotrophia</i> spp.	<i>[Prevotella]</i> spp.	<i>Leptotrichia</i> spp.	<i>Actinobaculum</i> spp.
<i>Anaerococcus</i> spp.	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Leucobacter</i> spp.	<i>Blvii28</i> spp.
<i>Arabidopsis</i> spp.	<i>Actinobacillus</i> spp.	<i>Leuconostoc</i> spp.	<i>Dechloromonas</i> spp.
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Actinomyces</i> spp.	<i>Limnohabitans</i> spp.	<i>Delftia</i> spp.
<i>Bdellovibrio</i> spp.	<i>Aggregatibacter</i> spp.	<i>Microbacterium</i> spp.	<i>Dialister</i> spp.
<i>Brachybacterium</i> spp.	<i>Arthrobacter</i> spp.	<i>Micrococcus</i> spp.	<i>Filifactor</i> spp.
<i>Catonella</i> spp.	<i>Bosea</i> spp.	<i>Moryella</i> spp.	<i>Flectobacillus</i> spp.
<i>Delftia</i> spp.	<i>Burkholderia</i> spp.	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>Geobacillus</i> spp.
<i>Dietzia</i> spp.	<i>Candidatus Rhodoluna</i> spp.	<i>Neisseria</i> spp.	<i>Hyphomicrobium</i> spp.
<i>Eikenella</i> spp.	<i>Capnocytophaga</i> spp.	<i>Paludibacter</i> spp.	<i>Iamia</i> spp.
<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Cardiobacterium</i> spp.	<i>Parvimonas</i> spp.	<i>Janthinobacterium</i> spp.
<i>Facklamia</i> spp.	<i>Chryseobacterium</i> spp.	<i>Pedobacter</i> spp.	<i>Kocuria</i> spp.
<i>Hydrogenophilus</i> spp.	<i>Clavibacter</i> spp.	<i>Porphyromonas</i> spp.	<i>Marinobacterium</i> spp.
<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Cloacibacterium</i> spp.	<i>Prevotella</i> spp.	<i>Mogibacterium</i> spp.
<i>Lysobacter</i> spp.	<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Propionibacterium</i> spp.	<i>Novosphingobium</i> spp.
<i>Moraxella</i> spp.	<i>Enhydrobacter</i> spp.	<i>Prosthecobacter</i> spp.	<i>Peptoniphilus</i> spp.
<i>Oribacterium</i> spp.	<i>Flavobacterium</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pleomorphomonas</i> spp.
<i>Paenibacillus</i> spp.	<i>Fluviicola</i> spp.	<i>Ralstonia</i> spp.	<i>Polynucleobacter</i> spp.
<i>Renibacterium</i> spp.	<i>Fusobacterium</i> spp.	<i>Rhodococcus</i> spp.	<i>Pragia</i> spp.
<i>Rhodoplanes</i> spp.	<i>Gemella</i> spp.	<i>Rothia</i> spp.	<i>Raoultella</i> spp.
<i>Saprolegnia</i> spp.	<i>Granulicatella</i> spp.	<i>Sphingomonas</i> spp.	<i>Rheinheimera</i> spp.
<i>Sphingobacterium</i> spp.	<i>Haemophilus</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Rubrobacter</i> spp.
<i>Sphingopyxis</i> spp.	<i>Kingella</i> spp.	<i>Stenotrophomonas</i> spp.	<i>Selenomonas</i> spp.
<i>Turicibacter</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Serratia</i> spp.
<i>Weissella</i> spp.	<i>Lautropia</i> spp.	<i>Veillonella</i> spp.	<i>Tannerella</i> spp.
<i>Zoogloea</i> spp.			<i>Uliginosibacterium</i> spp.
<i>Zymomonas</i> spp.			<i>Xanthobacter</i> spp.

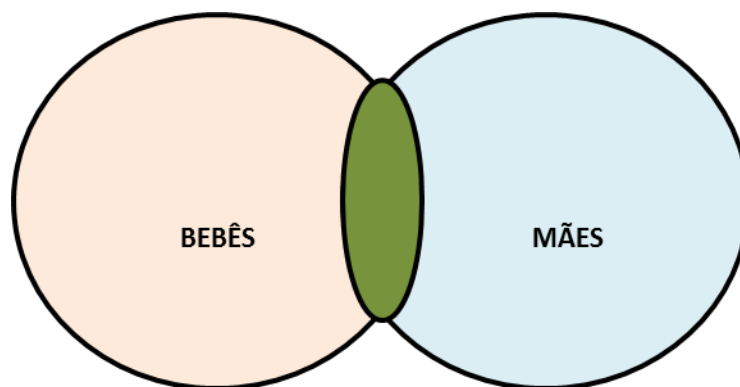


Figura 12 – Diagrama de Venn para representação dos gêneros presentes no biofilme dos bebês e suas mães, aos 12 meses de idade do bebê. A porção verde do diagrama apresenta os gêneros coincidentes nas duas populações.

<i>Abiotrophia</i> spp.	<i>[Prevotella]</i> spp.	<i>Leptotrichia</i> spp.	<i>Aggregatibacter</i> spp.
<i>Arthrobacter</i> spp.	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Mogibacterium</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.
<i>Atopobium</i> spp.	<i>Actinobacillus</i> spp.	<i>Moryella</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
<i>Bosea</i> spp.	<i>Actinomyces</i> spp.	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>Bdellovibrio</i> spp.
<i>Bulleidia</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Neisseria</i> spp.	<i>Bosea</i> spp.
<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Burkholderia</i> spp.	<i>Peptostreptococcus</i> spp.	<i>Brevibacterium</i> spp.
<i>Facklamia</i> spp.	<i>Capnocytophaga</i> spp.	<i>Porphyromonas</i> spp.	<i>Campylobacter</i> spp.
<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Cardiobacterium</i> spp.	<i>Prevotella</i> spp.	<i>Chryseobacterium</i> spp.
<i>Leucobacter</i> spp.	<i>Catonella</i> spp.	<i>Propionibacterium</i> spp.	<i>Clavibacter</i> spp.
<i>Leuconostoc</i> spp.	<i>Cloacibacterium</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Enhydrobacter</i> spp.
<i>Oribacterium</i> spp.	<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Ralstonia</i> spp.	<i>Fluviicola</i> spp.
<i>Rhodocytophaga</i> spp.	<i>Eikenella</i> spp.	<i>Rothia</i> spp.	<i>Geodermatophilus</i> spp.
<i>Saccharopolyspora</i> spp.	<i>Flavobacterium</i> spp.	<i>Rubrobacter</i> spp.	<i>Hydrogenophilus</i> spp.
<i>Turicibacter</i> spp.	<i>Fusobacterium</i> spp.	<i>Selenomonas</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.
	<i>Gemella</i> spp.	<i>Sphingomonas</i> spp.	<i>Megasphaera</i> spp.
	<i>Granulicatella</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Micrococcus</i> spp.
	<i>Haemophilus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Mycoplasma</i> spp.
	<i>Kingella</i> spp.	<i>Vagococcus</i> spp.	<i>Nevskia</i> spp.
	<i>Lautropia</i> spp.	<i>Veillonella</i> spp.	<i>Paludibacter</i> spp.
			<i>Paracoccus</i> spp.
			<i>Parvimonas</i> spp.
			<i>Pedobacter</i> spp.
			<i>Peptococcus</i> spp.
			<i>Pleomorphomonas</i> spp.
			<i>Rhodobacter</i> spp.
			<i>Ruminococcus</i> spp.
			<i>Sphingobium</i> spp.
			<i>TG5</i> spp.
			<i>Treponema</i> spp.

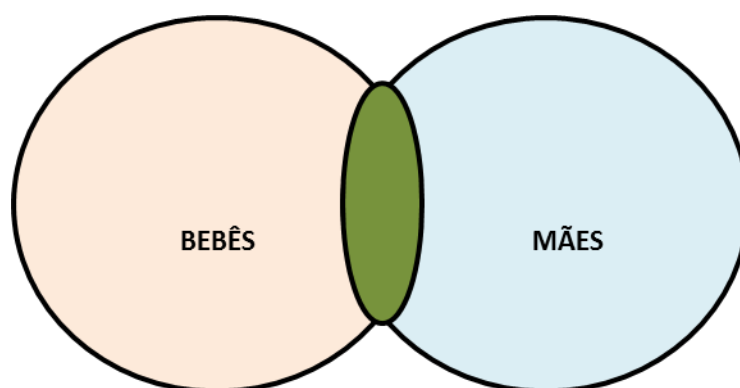


Figura 13 – Diagrama de Venn para representação dos gêneros presentes no biofilme dos bebês e suas mães, aos 18 meses de idade do bebê. A porção verde do diagrama apresenta os gêneros coincidentes nas duas populações.

<i>Abiotrophia</i> spp.	<i>[Prevotella]</i> spp.	<i>Kingella</i> spp.	<i>Actinobaculum</i> spp.	<i>Methylibium</i> spp.
<i>Dietzia</i> spp.	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Lautropia</i> spp.	<i>Alloicoccus</i> spp.	<i>Methylotenera</i> spp.
<i>Gordonia</i> spp.	<i>Actinobacillus</i> spp.	<i>Leptotrichia</i> spp.	<i>Anoxybacillus</i> spp.	<i>Microbacterium</i> spp.
<i>Limnohabitans</i> spp.	<i>Actinomyces</i> spp.	<i>Moraxella</i> spp.	<i>Arthrobacter</i> spp.	<i>Micrococcus</i> spp.
<i>Oribacterium</i> spp.	<i>Aggregatibacter</i> spp.	<i>Moryella</i> spp.	<i>Asticcacaulis</i> spp.	<i>Morganella</i> spp.
<i>Wolinella</i> spp.	<i>Anaerococcus</i> spp.	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>Atopobium</i> spp.	<i>Mycoplasma</i> spp.
	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Neisseria</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.	<i>Nesterenkonia</i> spp.
	<i>Bosea</i> spp.	<i>Paludibacter</i> spp.	<i>Candidatus Rhodoluna</i> spp.	<i>Ornithobacterium</i> spp.
	<i>Burkholderia</i> spp.	<i>Parvimonas</i> spp.	<i>Carnobacterium</i> spp.	<i>Pedobacter</i> spp.
	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Phascolarctobacterium</i> spp.	<i>Clostridium</i> spp.	<i>Phenylobacterium</i> spp.
	<i>Capnocytophaga</i> spp.	<i>Porphyromonas</i> spp.	<i>Delftia</i> spp.	<i>Polynucleobacter</i> spp.
	<i>Cardiobacterium</i> spp.	<i>Prevotella</i> spp.	<i>Faecalibacterium</i> spp.	<i>Renibacterium</i> spp.
	<i>Catonella</i> spp.	<i>Propionibacterium</i> spp.	<i>Gemmata</i> spp.	<i>Runella</i> spp.
	<i>Chryseobacterium</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Hyphomicrobium</i> spp.	<i>Salinibacterium</i> spp.
	<i>Clavibacter</i> spp.	<i>Ralstonia</i> spp.	<i>Janibacter</i> spp.	<i>Serratia</i> spp.
	<i>Cloacibacterium</i> spp.	<i>Rothia</i> spp.	<i>Janthinobacterium</i> spp.	<i>Sphingobacterium</i> spp.
	<i>Comamonas</i> spp.	<i>Selenomonas</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Sphingobium</i> spp.
	<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Sphingomonas</i> spp.
	<i>Eikenella</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Leucobacter</i> spp.	<i>Stenotrophomonas</i> spp.
	<i>Flavobacterium</i> spp.	<i>Tannerella</i> spp.	<i>Leuconostoc</i> spp.	<i>Terracoccus</i> spp.
	<i>Fusobacterium</i> spp.	<i>Turicibacter</i> spp.	<i>Luteolibacter</i> spp.	<i>Zoogloea</i> spp.
	<i>Gemella</i> spp.	<i>Vagococcus</i> spp.	<i>Megasphaera</i> spp.	
	<i>Granulicatella</i> spp.	<i>Veillonella</i> spp.		
	<i>Haemophilus</i> spp.			

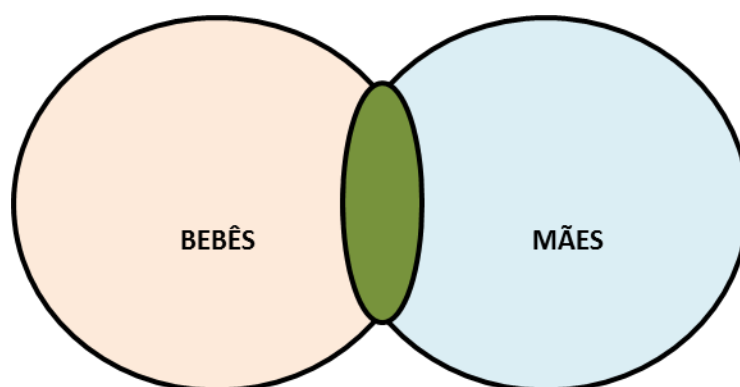


Figura 14 – Diagrama de Venn para representação dos gêneros presentes no biofilme dos bebês e suas mães, aos 24 meses de idade do bebê. A porção verde do diagrama apresenta os gêneros coincidentes nas duas populações.

Descrição dos resultados obtidos para o bebê que desenvolveu cárie

Os resultados da análise por pirosequenciamento das amostras de saliva e biofilme do bebê que desenvolveu lesões de cárie aos 18 meses de idade (bebê número 08) foram relatadas a seguir em quadros comparativos com os bebês saudáveis aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade do bebê.

Saliva

Observou-se a presença dos mesmos 7 Filos da saliva de bebês livres de cárie relatados acima ao longo do período experimental. Quanto ao número de gêneros, observou-se que aos 6 meses foram detectados dezesseis gêneros no bebê 08, sendo que quinze eram comum aos grupos (Quadro 12). Aos 12 meses, como observado na saliva de bebês livres de cárie, houve um aumento na quantidade de gêneros. Assim, vinte e três gêneros foram detectados no bebê 08, sendo que vinte eram comum aos grupos (Quadro 13). Aos 18 meses, período em que o bebê apresentou lesões de cárie, vinte e sete gêneros foram detectados no bebê 08, sendo que vinte e cinco gêneros foram comum aos grupos (Quadro 14). Aos 24 meses, foram detectados vinte e sete gêneros no bebê 08, sendo que 24 gêneros eram comuns aos grupos (Quadro 15).

Quadro 12 – Ocorrência e porcentagem dos gêneros nas amostras de saliva do bebê 08 e comparação com as porcentagens médias dos bebês livres de cárie aos 6 meses*

Bebê 08		Bebês livre de cárie	
[Prevotella] spp.	0,27	[Prevotella] spp.	4,29
Actinobacillus spp.	0,03	Actinobacillus spp.	0,03
Actinomyces spp.	0,01	Actinomyces spp.	0,64
		Aggregatibacter spp.	0,01
Burkholderia spp.	0,01	Burkholderia spp.	0,08
		Campylobacter spp.	0,01
		Capnocytophaga spp.	0,03
		Coprococcus spp.	0,01
		Corynebacterium spp.	0,07
		Fusobacterium spp.	0,15
Gemella spp.	0,99	Gemella spp.	1,28
Granulicatella spp.	0,49	Granulicatella spp.	5,17
Haemophilus spp.	0,40	Haemophilus spp.	0,38
Megasphaera spp.	0,01		
		Lactobacillus spp.	0,01
		Lautropia spp.	0,01
		Leptotrichia spp.	0,37
		Moryella spp.	0,01
Neisseria spp.	0,44	Neisseria spp.	0,36
Porphyromonas spp.	12,55	Porphyromonas spp.	0,20
		Oribacterium spp.	0,02
		Pedobacter spp.	0,01
		Phascolarctobacterium spp.	0,03
Prevotella spp.	0,60	Prevotella spp.	0,73
		Pseudomonas spp.	0,01
Rothia spp.	1,22	Rothia spp.	1,34
Selenomonas spp.	0,01	Selenomonas spp.	0,01
Staphylococcus spp.	0,01	Staphylococcus spp.	0,18
Streptococcus spp.	45,29	Streptococcus spp.	50,95
		Treponema spp.	0,01
Veillonella spp.	13,56	Veillonella spp.	11,58

*Porcentagens mais relevantes em negrito.

Quadro 13 – Ocorrência e porcentagem dos gêneros nas amostras de saliva do bebê 08 e comparação com as porcentagens médias dos bebês livres de cárie aos 12 meses*

(continua)

Bebê 08		Bebês livres de cárie	
<i>[Prevotella] spp.</i>	10,58	<i>[Prevotella] spp.</i>	7,92
		<i>Acinetobacter spp.</i>	0,005
<i>Actinobacillus spp.</i>	2,60	<i>Actinobacillus spp.</i>	0,38
<i>Actinomyces spp.</i>	0,10	<i>Actinomyces spp.</i>	0,41
<i>Aggregatibacter spp.</i>	0,30	<i>Aggregatibacter spp.</i>	0,05
		<i>Atopobium spp.</i>	0,002
<i>Bifidobacterium spp.</i>	0,02		
		<i>Burkholderia spp.</i>	0,02
<i>Blautia spp.</i>	0,02		
<i>Campylobacter spp.</i>	0,02	<i>Campylobacter spp.</i>	0,01
<i>Capnocytophaga spp.</i>	0,05	<i>Capnocytophaga spp.</i>	0,29
		<i>Cardiobacterium spp.</i>	0,02
		<i>Catonella spp.</i>	0,03
		<i>Chryseobacterium spp.</i>	0,002
		<i>Coprococcus spp.</i>	0,005
		<i>Corynebacterium spp.</i>	0,12
		<i>Eikenella spp.</i>	0,05
		<i>Facklamia spp.</i>	0,002
<i>Fusobacterium spp.</i>	0,03	<i>Fusobacterium spp.</i>	1,27
<i>Gemella spp.</i>	1,90	<i>Gemella spp.</i>	0,45
<i>Granulicatella spp.</i>	6,49	<i>Granulicatella spp.</i>	10,79
<i>Haemophilus spp.</i>	0,58	<i>Haemophilus spp.</i>	2,52
		<i>Kingella spp.</i>	0,01
<i>Lautropia spp.</i>	0,02	<i>Lautropia spp.</i>	0,04
<i>Leptotrichia spp.</i>	4,83	<i>Leptotrichia spp.</i>	0,30
		<i>Megasphaera spp.</i>	0,02
<i>Megamonas spp.</i>	0,02		
		<i>Microbacterium spp.</i>	0,002
		<i>Mogibacterium spp.</i>	0,002
		<i>Moraxella spp.</i>	0,01
<i>Neisseria spp.</i>	0,09	<i>Neisseria spp.</i>	3,32
		<i>Oribacterium spp.</i>	0,03
		<i>Peptococcus spp.</i>	0,002
		<i>Peptostreptococcus spp.</i>	0,002
		<i>Phascolarctobacterium spp.</i>	0,01

Quadro 13 – Ocorrência e porcentagem dos gêneros nas amostras de saliva do bebê 08 e comparação com as porcentagens médias dos bebês livres de cárie aos 12 meses*

(conclusão)

Bebê 08		Bebês livres de cárie	
<i>Porphyromonas</i> spp.	3,75	<i>Porphyromonas</i> spp.	3,37
<i>Prevotella</i> spp.	0,16	<i>Prevotella</i> spp.	1,36
		<i>Pseudomonas</i> spp.	0,002
<i>Rothia</i> spp.	0,65	<i>Rothia</i> spp.	0,33
		<i>Scardovia</i> spp.	0,002
<i>Selenomonas</i> spp.	0,02	<i>Selenomonas</i> spp.	0,50
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,02	<i>Staphylococcus</i> spp.	0,58
<i>Streptococcus</i> spp.	42,67	<i>Streptococcus</i> spp.	30,41
		<i>Syntrophomonas</i> spp.	0,01
		<i>Tannerella</i> spp.	0,02
		<i>Vagococcus</i> spp.	0,002
<i>Veillonella</i> spp.	1,10	<i>Veillonella</i> spp.	9,35

*Porcentagens mais relevantes em negrito.

Quadro 14 – Ocorrência e porcentagem dos gêneros nas amostras de saliva do bebê 08 e comparação com as porcentagens médias dos bebês livres de cárie aos 18 meses*

(continua)

Bebê 08		Bebês livre de cárie	
[<i>Prevotella</i>] spp.	5,13	[<i>Prevotella</i>] spp.	2,22
		[<i>Ruminococcus</i>] spp.	0,004
<i>Actinobacillus</i> spp.	3,01	<i>Actinobacillus</i> spp.	0,99
<i>Actinomyces</i> spp.	0,27	<i>Actinomyces</i> spp.	2,73
<i>Aggregatibacter</i> spp.	0,12	<i>Aggregatibacter</i> spp.	0,03
		<i>Alloiococcus</i> spp.	0,002
		<i>Atopobium</i> spp.	0,005
<i>Blautia</i> spp.	0,15		
<i>Burkholderia</i> spp.	0,78	<i>Burkholderia</i> spp.	5,22
<i>Campylobacter</i> spp.	0,03	<i>Campylobacter</i> spp.	0,01
<i>Capnocytophaga</i> spp.	3,16	<i>Capnocytophaga</i> spp.	0,76
<i>Cardiobacterium</i> spp.	0,24	<i>Cardiobacterium</i> spp.	0,01
		<i>Catonella</i> spp.	0,004
		<i>Conchiformibius</i> spp.	0,002
		<i>Coprococcus</i> spp.	0,002

Quadro 14 – Ocorrência e porcentagem dos gêneros nas amostras de saliva do bebê 08 e comparação com as porcentagens médias dos bebês livres de cárie aos 18 meses*

(conclusão)

Bebê 08		Bebês livre de cárie	
<i>Corynebacterium</i> spp.	0,48	<i>Corynebacterium</i> spp.	0,54
<i>Eikenella</i> spp.	0,54	<i>Eikenella</i> spp.	0,07
<i>Fusobacterium</i> spp.	0,09	<i>Fusobacterium</i> spp.	1,33
<i>Gemella</i> spp.	0,30	<i>Gemella</i> spp.	0,24
<i>Granulicatella</i> spp.	2,03	<i>Granulicatella</i> spp.	7,92
<i>Haemophilus</i> spp.	1,16	<i>Haemophilus</i> spp.	2,34
<i>Kingella</i> spp.	4,39	<i>Kingella</i> spp.	0,01
<i>Lautropia</i> spp.	0,27	<i>Lautropia</i> spp.	0,04
<i>Leptotrichia</i> spp.	1,58	<i>Leptotrichia</i> spp.	0,77
		<i>Megasphaera</i> spp.	0,005
		<i>Mogibacterium</i> spp.	0,002
		<i>Moraxella</i> spp.	0,005
		<i>Moryella</i> spp.	0,01
<i>Neisseria</i> spp.	2,09	<i>Neisseria</i> spp.	2,25
		<i>Nesterenkonia</i> spp.	0,002
		<i>Oribacterium</i> spp.	0,004
		<i>Peptococcus</i> spp.	0,002
		<i>Phascolarctobacterium</i> spp.	0,02
<i>Porphyromonas</i> spp.	2,80	<i>Porphyromonas</i> spp.	3,68
<i>Prevotella</i> spp.	0,24	<i>Prevotella</i> spp.	2,18
		<i>Propionibacterium</i> spp.	0,002
		<i>Pseudomonas</i> spp.	0,005
<i>Rothia</i> spp.	2,21	<i>Rothia</i> spp.	0,70
<i>Selenomonas</i> spp.	0,63	<i>Selenomonas</i> spp.	0,002
<i>Sphingomonas</i> spp.	0,06		
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,27	<i>Staphylococcus</i> spp.	1,07
		<i>Stenotrophomonas</i> spp.	0,002
<i>Streptococcus</i> spp.	31,83	<i>Streptococcus</i> spp.	28,66
		<i>Syntrophomonas</i> spp.	0,004
		TG5 spp.	0,002
		<i>Vagococcus</i> spp.	0,003
<i>Veillonella</i> spp.	8,77	<i>Veillonella</i> spp.	4,79

*Porcentagens mais relevantes em negrito.

Quadro 15 – Ocorrência e porcentagem dos gêneros nas amostras de saliva do bebê 08 e comparação com as porcentagens médias dos bebês livres de cárie aos 24 meses*

(continua)

Bebê 08		Bebês livre de cárie	
<i>[Prevotella]</i> spp.	0,21	<i>[Prevotella]</i> spp.	3,05
		<i>[Ruminococcus]</i> spp.	0,002
<i>Abiotrophia</i> spp.	0,06	<i>Abiotrophia</i> spp.	0,01
<i>Actinobacillus</i> spp.	6,15	<i>Actinobacillus</i> spp.	0,40
<i>Actinomyces</i> spp.	0,65	<i>Actinomyces</i> spp.	1,77
<i>Aggregatibacter</i> spp.	0,09	<i>Aggregatibacter</i> spp.	0,01
		<i>Alloiococcus</i> spp.	0,01
<i>Burkholderia</i> spp.	0,06	<i>Burkholderia</i> spp.	0,57
<i>Capnocytophaga</i> spp.	1,33	<i>Capnocytophaga</i> spp.	2,00
<i>Cardiobacterium</i> spp.	0,09	<i>Cardiobacterium</i> spp.	0,01
		<i>Catonella</i> spp.	0,03
		<i>Coprococcus</i> spp.	0,005
<i>Corynebacterium</i> spp.	0,41	<i>Corynebacterium</i> spp.	1,23
<i>Eikenella</i> spp.	0,38	<i>Eikenella</i> spp.	0,30
<i>Facklamia</i> spp.	0,03	<i>Facklamia</i> spp.	0,002
<i>Fusobacterium</i> spp.	0,06	<i>Fusobacterium</i> spp.	0,30
<i>Gemella</i> spp.	0,24	<i>Gemella</i> spp.	0,83
<i>Granulicatella</i> spp.	0,92	<i>Granulicatella</i> spp.	7,45
<i>Haemophilus</i> spp.	1,89	<i>Haemophilus</i> spp.	1,05
		<i>Janthinobacterium</i> spp.	0,19
<i>Kingella</i> spp.	0,41	<i>Kingella</i> spp.	0,04
<i>Lautropia</i> spp.	7,92	<i>Lautropia</i> spp.	0,48
<i>Leptotrichia</i> spp.	0,12	<i>Leptotrichia</i> spp.	1,46
		<i>Mogibacterium</i> spp.	0,002
		<i>Moryella</i> spp.	0,02
<i>Neisseria</i> spp.	5,20	<i>Neisseria</i> spp.	3,35
		<i>Oribacterium</i> spp.	0,01
<i>Nesterenkonia</i> spp.	0,03		
		<i>Parvimonas</i> spp.	0,01
		<i>Peptostreptococcus</i> spp.	0,005
		<i>Phascolarctobacterium</i> spp.	0,01
<i>Porphyromonas</i> spp.	1,21	<i>Porphyromonas</i> spp.	4,70
<i>Prevotella</i> spp.	0,18	<i>Prevotella</i> spp.	2,15
		<i>Propionibacterium</i> spp.	0,19
		<i>Pseudomonas</i> spp.	0,95

Quadro 15 – Ocorrência e porcentagem dos gêneros nas amostras de saliva do bebê 08 e comparação com as porcentagens médias dos bebês livres de cárie aos 24 meses*

(conclusão)

Bebê 08		Bebês livre de cárie	
<i>Rothia</i> spp.	7,89	<i>Rothia</i> spp.	3,51
<i>Selenomonas</i> spp.	0,03		
		<i>Sphingomonas</i> spp.	0,19
		<i>Staphylococcus</i> spp.	0,16
<i>Streptococcus</i> spp.	19,78	<i>Streptococcus</i> spp.	31,26
		<i>Vagococcus</i> spp.	0,002
<i>Turicibacter</i> spp.	0,03		
<i>Veillonella</i> spp.	0,59	<i>Veillonella</i> spp.	3,65

*Porcentagens mais relevantes em negrito.

Biofilme

Observou-se a presença de 8 Filos representativos nas amostras de biofilme do bebê 08: Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, TM7, SR1 e Cyanobacteria.

Os resultados da análise do pirosequenciamento para o biofilme do bebê 08 aos 6 meses de idade encontram-se em Apêndice J, pois os demais bebês não tinham dentes erupcionados no momento desta coleta para comparação.

Quanto ao número de gêneros, observou-se que aos 12 meses foram detectados quatorze gêneros no bebê 08, sendo que quatorze eram comum aos grupos (Quadro 16). Aos 18 meses, período em que o bebê apresentou lesões de cárie, foram detectados dezesseis gêneros no bebê 08, sendo que quatorze eram comum aos grupos (Quadro 17). Porém, o que chama a atenção é a alta porcentagem do grupo *Streptococcus* spp. no bebê com lesões de cárie quando comparado ao grupo livre de cárie. Aos 24 meses, foram detectados trinta

gêneros no bebê 08, sendo que 26 gêneros eram comum aos grupos (Quadro 18).

Quadro 16 – Ocorrência e porcentagem dos gêneros nas amostras de biofilme do bebê 08 e comparação com as porcentagens médias dos bebês livres de cárie aos 12 meses*

(continua)

Bebê 08		Bebês livre de cárie	
<i>[Prevotella]</i> spp.	0,33	<i>[Prevotella]</i> spp.	0,09
<i>Abiotrophia</i> spp.	0,01	<i>Abiotrophia</i> spp.	0,03
		<i>Acinetobacter</i> spp.	0,07
		<i>Actinobacillus</i> spp.	0,73
<i>Actinomyces</i> spp.	1,33	<i>Actinomyces</i> spp.	3,95
		<i>Aggregatibacter</i> spp.	0,06
		<i>Anaerococcus</i> spp.	0,03
		<i>Arabidopsis</i> spp.	0,002
		<i>Arthrobacter</i> spp.	0,04
		<i>Bacillus</i> spp.	0,03
		<i>Bdellovibrio</i> spp.	0,01
		<i>Bosea</i> spp.	0,12
		<i>Brachybacterium</i> spp.	0,03
		<i>Burkholderia</i> spp.	0,19
		<i>Candidatus Rhodoluna</i> spp.	0,03
<i>Capnocytophaga</i> spp.	0,05	<i>Capnocytophaga</i> spp.	1,91
		<i>Cardiobacterium</i> spp.	0,19
		<i>Catonella</i> spp.	0,02
		<i>Chryseobacterium</i> spp.	0,11
		<i>Clavibacter</i> spp.	0,01
		<i>Cloacibacterium</i> spp.	0,04
		<i>Corynebacterium</i> spp.	1,07
		<i>Delftia</i> spp.	0,02
		<i>Dietzia</i> spp.	0,01
		<i>Eikenella</i> spp.	0,25
		<i>Enhydrobacter</i> spp.	0,03
		<i>Enterococcus</i> spp.	0,002
		<i>Facklamia</i> spp.	0,01
		<i>Flavobacterium</i> spp.	0,14
		<i>Fluviicola</i> spp.	0,02

Quadro 16 – Ocorrência e porcentagem dos gêneros nas amostras de biofilme do bebê 08 e comparação com as porcentagens médias dos bebês livres de cárie aos 12 meses*

(continuação)

Bebê 08		Bebês livre de cárie	
		<i>Fusobacterium</i> spp.	0,31
<i>Gemella</i> spp.	0,37	<i>Gemella</i> spp.	1,09
<i>Granulicatella</i> spp.	1,61	<i>Granulicatella</i> spp.	3,06
		<i>Haemophilus</i> spp.	1,43
		<i>Hydrogenophilus</i> spp.	0,002
<i>Kingella</i> spp.	0,04	<i>Kingella</i> spp.	0,45
		<i>Klebsiella</i> spp.	0,23
		<i>Lactococcus</i> spp.	0,04
		<i>Lautropia</i> spp.	0,92
<i>Leptotrichia</i> spp.	0,06	<i>Leptotrichia</i> spp.	0,19
		<i>Leucobacter</i> spp.	0,03
		<i>Leuconostoc</i> spp.	0,03
		<i>Limnohabitans</i> spp.	0,002
		<i>Lysobacter</i> spp.	0,01
		<i>Microbacterium</i> spp.	0,02
		<i>Micrococcus</i> spp.	0,02
		<i>Moraxella</i> spp.	0,01
		<i>Moryella</i> spp.	0,002
		<i>Mycobacterium</i> spp.	0,05
<i>Neisseria</i> spp.	0,01	<i>Neisseria</i> spp.	3,53
		<i>Oribacterium</i> spp.	0,01
		<i>Paenibacillus</i> spp.	0,01
		<i>Paludibacter</i> spp.	0,02
		<i>Parvimonas</i> spp.	0,03
		<i>Pedobacter</i> spp.	0,002
		<i>Porphyromonas</i> spp.	1,30
<i>Prevotella</i> spp.	2,68	<i>Prevotella</i> spp.	0,11
		<i>Propionibacterium</i> spp.	2,02
		<i>Prostheco bacter</i> spp.	0,004
		<i>Pseudomonas</i> spp.	7,47
		<i>Ralstonia</i> spp.	0,05
		<i>Renibacterium</i> spp.	0,02
		<i>Rhodococcus</i> spp.	0,01

Quadro 16 – Ocorrência e porcentagem dos gêneros nas amostras de biofilme do bebê 08 e comparação com as porcentagens médias dos bebês livres de cárie aos 12 meses*

(conclusão)

Bebê 08		Bebês livre de cárie	
		<i>Rhodoplanes</i> spp.	0,004
<i>Rothia</i> spp.	0,72	<i>Rothia</i> spp.	0,19
		<i>Saprolegnia</i> spp.	0,004
		<i>Sphingobacterium</i> spp.	0,002
		<i>Sphingomonas</i> spp.	0,06
		<i>Sphingopyxis</i> spp.	0,002
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,01	<i>Staphylococcus</i> spp.	0,21
		<i>Stenotrophomonas</i> spp.	0,03
<i>Streptococcus</i> spp.	59,98	<i>Streptococcus</i> spp.	17,43
		<i>Turicibacter</i> spp.	0,01
<i>Veillonella</i> spp.	2,03	<i>Veillonella</i> spp.	0,48
		<i>Weissella</i> spp.	0,01
		<i>Zoogloea</i> spp.	0,002
		<i>Zymomonas</i> spp.	0,002

*Porcentagens mais relevantes em negrito.

Quadro 17 – Ocorrência e porcentagem dos gêneros nas amostras de biofilme do bebê 08 e comparação com as porcentagens médias dos bebês livres de cárie aos 18 meses*

(continua)

Bebê 08		Bebês livre de cárie	
<i>Actinobacillus</i> spp.	0,10		
<i>Actinomyces</i> spp.	1,51	<i>Actinomyces</i> spp.	13,23
		<i>[Prevotella]</i> spp.	0,08
		<i>Abiotrophia</i> spp.	0,09
		<i>Acinetobacter</i> spp.	0,003
		<i>Actinobacillus</i> spp.	0,06
		<i>Arthrobacter</i> spp.	0,01
<i>Atopobium</i> spp.	0,42	<i>Atopobium</i> spp.	0,02
		<i>Bifidobacterium</i> spp.	0,01
		<i>Bosea</i> spp.	0,01
		<i>Bulleidia</i> spp.	0,01
		<i>Burkholderia</i> spp.	1,21
		<i>Capnocytophaga</i> spp.	7,01
		<i>Cardiobacterium</i> spp.	0,04

Quadro 17 – Ocorrência e porcentagem dos gêneros nas amostras de biofilme do bebê 08 e comparação com as porcentagens médias dos bebês livres de cárie aos 18 meses*

(continuação)

Bebê 08		Bebês livre de cárie	
		<i>Catonella</i> spp.	0,01
		<i>Cloacibacterium</i> spp.	0,01
		<i>Corynebacterium</i> spp.	3,27
		<i>Eikenella</i> spp.	0,16
		<i>Enterococcus</i> spp.	0,003
		<i>Facklamia</i> spp.	0,003
		<i>Flavobacterium</i> spp.	0,01
<i>Fusobacterium</i> spp.	0,02	<i>Fusobacterium</i> spp.	0,25
<i>Gemella</i> spp.	0,40	<i>Gemella</i> spp.	0,86
		<i>Granulicatella</i> spp.	5,12
<i>Haemophilus</i> spp.	0,12	<i>Haemophilus</i> spp.	2,79
<i>Kingella</i> spp.	0,02	<i>Kingella</i> spp.	0,17
		<i>Klebsiella</i> spp.	0,02
<i>Lactobacillus</i> spp.	0,46		
		<i>Lautropia</i> spp.	0,60
<i>Leptotrichia</i> spp.	0,02	<i>Leptotrichia</i> spp.	0,81
		<i>Leucobacter</i> spp.	0,003
		<i>Leuconostoc</i> spp.	0,01
		<i>Mogibacterium</i> spp.	0,02
		<i>Moryella</i> spp.	0,02
		<i>Mycobacterium</i> spp.	0,01
<i>Neisseria</i> spp.	0,20	<i>Neisseria</i> spp.	1,33
		<i>Oribacterium</i> spp.	0,01
		<i>Peptostreptococcus</i> spp.	0,003
<i>Porphyromonas</i> spp.	0,08	<i>Porphyromonas</i> spp.	0,86
<i>Prevotella</i> spp.	3,12	<i>Prevotella</i> spp.	0,72
		<i>Propionibacterium</i> spp.	0,12
		<i>Pseudomonas</i> spp.	0,28
		<i>Ralstonia</i> spp.	0,002
		<i>Rhodocytophaga</i> spp.	0,01
<i>Rothia</i> spp.	1,75	<i>Rothia</i> spp.	4,32
		<i>Rubrobacter</i> spp.	0,003
		<i>Saccharopolyspora</i> spp.	0,003
<i>Selenomonas</i> spp.	0,79	<i>Selenomonas</i> spp.	0,01
		<i>Sphingomonas</i> spp.	0,05

Quadro 17 – Ocorrência e porcentagem dos gêneros nas amostras de biofilme do bebê 08 e comparação com as porcentagens médias dos bebês livres de cárie aos 18 meses*

(conclusão)

Bebê 08		Bebês livre de cárie	
		<i>Staphylococcus</i> spp.	0,02
<i>Streptococcus</i> spp.	57,81	<i>Streptococcus</i> spp.	26,57
		<i>Turicibacter</i> spp.	0,01
		<i>Vagococcus</i> spp.	0,004
<i>Veillonella</i> spp.	2,52	<i>Veillonella</i> spp.	1,32

*Porcentagens mais relevantes em negrito.

Quadro 18 – Ocorrência e porcentagem dos gêneros nas amostras de biofilme do bebê 08 e comparação com as porcentagens médias dos bebês livres de cárie aos 24 meses*

(continua)

Bebê 08		Bebês livre de cárie	
<i>[Prevotella]</i> spp.	0,03	<i>[Prevotella]</i> spp.	0,07
<i>Abiotrophia</i> spp.	0,37	<i>Abiotrophia</i> spp.	0,18
		<i>Acinetobacter</i> spp.	0,003
<i>Actinobacillus</i> spp.	0,21	<i>Actinobacillus</i> spp.	0,06
<i>Actinomyces</i> spp.	5,37	<i>Actinomyces</i> spp.	6,34
<i>Aggregatibacter</i> spp.	0,03	<i>Aggregatibacter</i> spp.	0,05
		<i>Anaerococcus</i> spp.	0,003
		<i>Bacillus</i> spp.	0,003
		<i>Bosea</i> spp.	0,02
<i>Blautia</i> spp.	0,03		
		<i>Burkholderia</i> spp.	0,39
		<i>Campylobacter</i> spp.	0,02
<i>Capnocytophaga</i> spp.	0,03	<i>Capnocytophaga</i> spp.	10,22
		<i>Cardiobacterium</i> spp.	0,77
<i>Catonella</i> spp.	0,03	<i>Catonella</i> spp.	0,02
		<i>Chryseobacterium</i> spp.	0,01
		<i>Clavibacter</i> spp.	0,01
		<i>Cloacibacterium</i> spp.	0,01
		<i>Comamonas</i> spp.	0,003
<i>Corynebacterium</i> spp.	3,93	<i>Corynebacterium</i> spp.	10,84
		<i>Dietzia</i> spp.	0,003
<i>Eikenella</i> spp.	0,08	<i>Eikenella</i> spp.	0,09

Quadro 18 – Ocorrência e porcentagem dos gêneros nas amostras de biofilme do bebê 08 e comparação com as porcentagens médias dos bebês livres de cárie aos 24 meses*

(conclusão)

Bebê 08		Bebês livre de cárie	
		<i>Flavobacterium</i> spp.	0,003
<i>Fusobacterium</i> spp.	0,08	<i>Fusobacterium</i> spp.	0,61
<i>Gemella</i> spp.	0,21	<i>Gemella</i> spp.	0,56
		<i>Gordonia</i> spp.	0,01
<i>Granulicatella</i> spp.	1,41	<i>Granulicatella</i> spp.	2,78
<i>Haemophilus</i> spp.	0,60	<i>Haemophilus</i> spp.	0,54
		<i>Kingella</i> spp.	0,53
<i>Lautropia</i> spp.	1,15	<i>Lautropia</i> spp.	0,59
<i>Leptotrichia</i> spp.	0,10	<i>Leptotrichia</i> spp.	0,53
		<i>Limnohabitans</i> spp.	0,01
<i>Morganella</i> spp.	0,03		
		<i>Moraxella</i> spp.	0,10
		<i>Moryella</i> spp.	0,003
		<i>Mycobacterium</i> spp.	0,003
<i>Neisseria</i> spp.	2,28	<i>Neisseria</i> spp.	3,47
<i>Oribacterium</i> spp.	0,03	<i>Oribacterium</i> spp.	0,01
		<i>Paludibacter</i> spp.	0,003
		<i>Parvimonas</i> spp.	0,01
		<i>Phascolarctobacterium</i> spp.	0,01
<i>Porphyromonas</i> spp.	0,08	<i>Porphyromonas</i> spp.	1,30
<i>Prevotella</i> spp.	0,13	<i>Prevotella</i> spp.	2,31
<i>Propionibacterium</i> spp.	0,03	<i>Propionibacterium</i> spp.	0,04
<i>Pseudomonas</i> spp.	0,03	<i>Pseudomonas</i> spp.	0,38
		<i>Ralstonia</i> spp.	0,01
<i>Rothia</i> spp.	17,59	<i>Rothia</i> spp.	6,70
		<i>Selenomonas</i> spp.	0,08
		<i>Staphylococcus</i> spp.	0,21
<i>Sphingopyxis</i> spp.	0,03		
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	0,03		
<i>Streptococcus</i> spp.	35,88	<i>Streptococcus</i> spp.	17,25
<i>Tannerella</i> spp.	0,03	<i>Tannerella</i> spp.	0,04
<i>Treponema</i> spp.	0,03		
		<i>Turicibacter</i> spp.	0,01
		<i>Vagococcus</i> spp.	0,003
<i>Veillonella</i> spp.	0,44	<i>Veillonella</i> spp.	0,59

*Porcentagens mais relevantes em negrito.

6 DISCUSSÃO

A cárie dental é a doença crônica mais comum na infância, consistindo em um grande problema para a saúde pública mundial (Misra et al., 2007). Estudos realizados no Brasil afirmam que a prevalência de cárie na infância varia de 12 a 46%, sendo que a faixa etária que desenvolve mais cárie é de 1 a 3 anos de idade (Dini et al., 2000; Bönecker et al., 2002).

Um fator importante que deve ser levado em consideração é que ela pode ser prevenida, controlada ou mesmo revertida. Dentro deste contexto, ressalta-se a importância de programas de prevenção em saúde bucal com o objetivo de orientação dos pais desde o nascimento dos bebês.

Em nosso estudo, observou-se bom nível de escolaridade das mães, além de poder sócio-econômico em sua maioria representado por baixo superior e médio inferior, de acordo com a classificação de Pastore e Silva (2000). Ismail e Sohn (2001) afirmaram que variáveis como nível sócio-econômico, dieta alimentar, hábitos de higiene e período da primeira consulta ao cirurgião-dentista, não podem ser consideradas isoladamente para avaliação de risco de cárie. 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.

Quanto à dieta, notou-se um perfil de desenvolvimento dentro dos padrões normais, porém não ideais. Apesar da OMS (1998)

recomendar o aleitamento materno exclusivo até os 6 meses de idade do bebê, observou-se que apenas 33,0% dos bebês eram amamentados exclusivamente no peito. Além disso, hábitos de alimentação como acordar para mamar e dormir mamando estavam presentes. O hábito de dormir mamando reduziu significativamente ao longo do período provavelmente em função das orientações fornecidas para as mães. Dentre os hábitos, os que mais contribuem para o desenvolvimento da doença cárie são dormir com mamadeira, dificuldade na higiene dental da criança e manter líquidos na boca por período prolongado, principalmente durante o sono (Tiberia et al., 2007; Reisine, Douglas, 1998; Ismail et al., 2008).

Tankkunnasombut et al. (2009) analisando crianças nos três primeiros anos de vida, encontrou correlação do tipo de leite e uso da mamadeira com maior colonização por *S. mutans*. Os autores ressaltaram que no caso da mamadeira, o tempo de uso pela criança é fator que influencia de forma positiva a colonização.

Llena e Forner (2008) afirmaram ainda que o consumo de alimentos entre as refeições tende a aumentar com a idade, e este fato geralmente está associado à queda na frequência de escovação. O que observamos em nosso estudo foi o aumento de alimentação cariogênica ao longo do período experimental, porém hábitos de higiene bucal tiveram maior adesão no decorrer do tempo, provavelmente pelas orientações fornecidas às mães dentro do programa preventivo.

Apesar da observação de hábitos e dieta de risco à cárie crescentes no decorrer do tempo na maioria das crianças estudadas e do alto índice CPO-D das mães, apenas 1 bebê apresentou lesões de cárie aos 18 meses de idade, mostrando que o programa foi efetivo no propósito de prevenção para este estudo.

A cavidade oral e tecidos adjacentes representam o mais complexo e diverso microbioma do corpo humano. Diversas comunidades microbianas são encontradas na superfície dentária, sulco gengival e

mucosas (Samaranayake, 2006). Estudos têm mostrado que a cavidade oral é colonizada por comunidades microbianas distintas nas diferentes estruturas (Aas et al., 2005; Mager et. al, 2003). Cerca de 280 espécies bacterianas foram isoladas da cavidade oral por métodos de cultura, porém menos da metade das espécies bacterianas são cultiváveis (Paster et al., 2001).

Assim, a aplicação das técnicas moleculares foi um passo essencial para a geração de novos conhecimentos nesta área. Técnicas moleculares independentes de cultura, tais como a eletroforese em gel com gradiente de desnaturação PCR (DGGE), análise de *microarray*, clonagem por PCR e técnicas de sequenciamento revolucionaram nossa compreensão sobre a microbiota oral. Dentro deste contexto, o pirosequenciamento ganha destaque por trabalhar com análise de largas quantidades de amostras com baixo custo e rapidez (Ronaghi, Elahi, 2002; Meyer et al., 2008). Ainda, este método proporciona a detecção e a discriminação de uma ampla filogenia e quantificação da abundância microbiana (Petrosino et al., 2009). Para este estudo utilizou-se a região hipervariável V5-V6 do gene RNAr 16S como proposto por Zaura et al. (2009).

A maior parte dos estudos para avaliação do estabelecimento de microbiota em crianças utilizando técnicas de cultura focou na aquisição de *Streptococcus mutans* e lactobacilos, procurando por possível correlação com a ocorrência de cáries (Caufield et al., 1993; Roeters et al., 1995). Estudos por pirosequenciamento caracterizaram a microbiota de recém-nascidos por tipos de partos diferentes, crianças edêntulas, crianças de 3 a 18 anos (Domingues Belle et al., 2010; Cephas et al., 2011; Crielaard et al., 2011; Ling et al., 2013; Xu et al., 2014; Jiang et al., 2014; Gomar-Vercher et al., 2014). Contudo, não foram detectados na literatura relatos de estudos longitudinais, por pirosequenciamento, avaliando a microbiota oral de bebês e suas respectivas mães aos 6, 12, 18 e 24 meses com metodologias cultura-independente.

Assim, este estudo teve como escopo central avaliar o microbioma oral do bebê saudável e livre de cárie dos 6 meses aos 24 meses de idade. O entendimento da composição da microbiota oral em relação à saúde bucal é essencial para a prevenção e tratamento de doenças orais. Para este fim, 5 pares de bebês e mães foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão estabelecidos, e dos perfis de dieta, higiene bucal, presença de dentes, prevalência de cárie e condições periodontais dos bebês. O objetivo foi a detecção de bebês com perfis similares quanto aos critérios citados e com saúde geral e bucal, além da não ocorrência de cáries dentárias.

Para a avaliação da microbiota de bebês e suas respectivas mães, o uso de saliva, método útil para representação do ecossistema da cavidade bucal, acessível e não agressiva, foi utilizado (Yang et al., 2012). Para os bebês a saliva foi coletada com o auxílio de *swab* estéril e para as mães o uso de saliva estimulada com a mastigação de fragmento de Parafilm (Zaura et al., 2009). Amostra de biofilme dentário também foi coletada com o auxílio de *microbrushs* a fim de se estudar a comunidade microbiana presente (Zaura et al., 2009). O biofilme dentário constitui um importante meio de estudo, pois o desenvolvimento e maturação da placa dental como um biofilme têm profundas implicações na etiologia e progressão das mais variadas infecções prevalentes que afetam os seres humanos, incluindo a cárie dentária (Sánchez et al., 2011).

Os achados deste estudo demonstraram rica comunidade microbiana na cavidade bucal do bebê mesmo antes da erupção dentária. Este resultado está de acordo com Cephas et al. (2011). Estes autores avaliaram por pirosequenciamento a microbiota presente na saliva de 5 bebês edêntulos com idade média de $4,6 \pm 1,2$ meses de idade e sua respectiva mãe ou cuidadora. Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, e Fusobacteria estavam predominantes em todas as amostras. *Streptococcus* foi o gênero predominante na saliva

infantil (62,2% contra 20,4% em adultos), assim como em nosso estudo 50,95% e 13,16% aos seis meses de idade do bebê, 30,41% e 11,92% aos doze meses, 26,66% e 15,39% aos 18 meses e 31,25% e 10,56% ao vinte e quatro meses.

A diversidade microbiana da saliva dos bebês manteve-se estável em relação ao número de Filos ao longo dos períodos. Actinobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria, Proteobacteria, TM7 e SR1 não apresentaram diferenças significativas ao longo do tempo. O único Filo com diferença significativa estatística foi o Filo Fimicutes que apresentou redução de 6 meses aos 18 meses de idade do bebê ($p=0.0198$). O gênero mais abundante foi *Streptococcus* spp. Estes resultados estão de acordo com estudos de Gomar-Vercher et al. (2014), Ling et al. (2010, 2013) que também encontraram abundância desse gênero em suas amostras em crianças de diferentes idades, 12 anos de idade, 3 a 6 anos de idade, e 3 a 6 anos respectivamente.

Observa-se também um aumento considerável na presença de gêneros dos 6 meses aos 12 meses de idade do bebê, sendo que esta distribuição se mantém nos demais períodos. *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp., *Burkholderia* spp., *Capnocytophaga* spp., *Corynebacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Gemella* spp., *Granulicatella* spp., *Haemophilus* spp., *Leptotrichia* spp., *Neisseria* spp., *Porphyromonas* spp., *[Prevotella]* spp. (família Paraprevotellaceae), *Prevotella* spp., *Rothia* spp., *Veillonella* spp. foram predominantes na saliva dos bebês ao longo do período experimental. Alguns desses gêneros são potencialmente cariogênicos, tais como *Streptococcus*, *Actinomyces*, e *Veillonella* (Aas et al., 2008).

Em nosso estudo, observamos a ocorrência de 8 Filos no biofilme dentário dos bebês ao longo do período longitudinal: Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, TM7 e SR1. Aos 6 meses de idade, nenhum dos 5 bebês avaliados apresentava dentes erupcionados que permitissem a coleta de

biofilme dentário e por este motivo a análise de biofilme foi iniciada aos 12 meses de idade. Apenas o bebê que desenvolveu cárie aos dezoito meses de idade tinha dentes erupcionados.

A diversidade microbiana do biofilme dos bebês manteve-se estável em relação ao número de Filos e não houve diferenças significativas ao longo do tempo entre os mesmos. Também no biofilme houve prevalência do gênero *Streptococcus* spp. em todos os períodos experimentais. Observou-se aumento da ocorrência dos Filos Actinobacteria e Bacteroidetes. Estes achados corroboram com estudos sobre o biofilme dentário, onde o gênero *Actinomyces* acompanhado do gênero *Streptococcus* ganham destaque na formação inicial de biofilme dentário, desempenhando um papel muito importante no processo de formação da cárie dentária (Dige et al., 2009; Aas et al., 2008).

Aos 12 meses, 77 diferentes gêneros fazem parte da microbiota, o que chama atenção pela grande diversidade. Este número é mais elevado em relação ao encontrado para a saliva dos bebês. Ainda, destacou-se os gêneros *Actinomyces* spp., *Capnocytophaga* spp., *Corynebacterium* spp., *Gemella* spp., *Granulicatella* spp., *Haemophilus* spp., *Neisseria*, *Porphyromonas* spp., *Pseudomonas* e *Propionibacterium* spp. *Actinomyces*, *Burkholderia* spp., *Capnocytophaga* spp., *Corynebacterium* spp., *Granulicatella* spp., *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Rothia* spp., *Veillonella* spp. Aos 18 meses, detectaram-se em porcentagens representativas os gêneros *Actinomyces*, *Rothia*, *Granulicatella* e *Capnocytophaga*. Aos 24 meses, os gêneros *Corynebacterium* spp., *Capnocytophaga* spp., *Prevotella* spp., *Rothia* spp. foram encontrados com maior ocorrência em relação aos demais períodos experimentais. Estes achados estão de acordo com o estudo de Jiang et al. (2014) que encontrou os mesmos gêneros em estado de saúde bucal do biofilme de crianças de 3 a 7 anos, o que sugere que não existe modificação significativa neste rol de gêneros nos primeiros anos de vida da criança.

Xu et al. (2014) avaliaram o biofilme supragengival para caracterização filogenética de 10 crianças com cárie e 9 sem cárie, todas com menos de 30 meses e antes da erupção dos segundos molares usando a metodologia do sequenciamento 454 e relataram que algumas espécies, como *Streptococcus* e *Veillonella*, estavam mais presentes em crianças abaixo de 30 meses com cáries em relação a cáries-free. Em nosso estudo, o bebê que desenvolveu cárie apresentou aos 18 meses porcentagem representativa de *Streptococcus* e *Veillonella* tanto na saliva quanto no biofilme.

O Filo Cyanobacteria foi detectado em algumas amostras. Pertencem a este Filo bactérias exógenas transitórias, encontradas em plantas. Como praticamente todos os seres humanos tem o hábito de ingerir vegetais, é comum que as sequências do cloroplasto 16S rRNA sejam detectadas no interior da cavidade oral (Dewhirst et al., 2010).

Para a avaliação das mães também foram coletadas amostras de saliva e biofilme ao longo do período experimental, mas não foram analisados quanto à modificação de composição longitudinal intra-grupo. A coleta destes dados tem o objetivo de subsidiar a comparação de porcentagens médias entre os grupos de bebês e mães.

A avaliação da saliva das mães por pirosequenciamento estão de acordo com os estudos de Ling et al. (2013), que avaliaram a microbiota por pirosequenciamento 454 da saliva não estimulada de 10 jovens adultos entre 22 e 24 anos com o objetivo de obter as características da microbiota de pacientes saudáveis. Os gêneros mais detectados foram *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Gemella*, *Rothia*, *Granulicatella*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Veillonella*, e *Aggregatibacter*, considerados os maiores constituintes da microbiota normal.

Ao longo do período experimental, 8 Filos receberam destaque na composição da microbiota da saliva das mães:

Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, SR1, Spirochaetes e TM7. Sendo ainda, o Filo Firmicutes o mais representativo, mas em menor quantidade quando comparado à saliva dos bebês.

Os gêneros *Actinomyces* spp., *Rothia* spp., *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., [*Prevotella*] spp., *Gemella* spp., *Granulicatella* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Veillonella* spp., *Fusobacterium* spp., *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp. foram os gêneros mais representativos, corroborando com os estudos de Zaura et al. (2009). Estes autores avaliaram a saliva estimulada de 3 adultos saudáveis e obtiveram destaque para os Filos Firmicutes (gênero *Streptococcus*, família *Veillonellaceae*, gênero *Granulicatella*), Proteobacteria (gênero *Neisseria*, *Haemophilus*), Actinobacteria (gênero *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*), Bacteroidetes (gênero *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas*) e Fusobacteria (gênero *Fusobacterium*). De acordo com os autores, obteve-se a primeira perspectiva da diversidade e singularidade do microbioma oral saudável do indivíduo com uma resolução de sequenciamento de última geração, definindo assim o cerne da microbiota saudável.

Um total de 11 Filos foi detectado no biofilme dentário das mães. Esta variabilidade foi consideravelmente maior do que o encontrado na saliva. Este fator pode ser explicado pela característica morfológica do próprio biofilme, ou seja, uma comunidade microbiana embebida em polímeros. Novos Filos ganham destaque além dos acima relatados: Chlorobi, Cyanobacteria, Spirochaetes e Verrucomicrobia. Todos os táxons identificados do Filo Spirochaetes são membros do gênero *Treponema* spp. corroborando o estudo de Dewhirst et al. (2010).

Gêneros como *Actinomyces* spp., *Corynebacterium* spp., *Rothia* spp., *Burkholderia* spp., *Lautropia* spp., *Pseudomonas* spp. tiveram percentuais representativos mais elevados com relação aos demais no biofilme das mães. A elevada ocorrência de *Actinomyces* 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). Este gênero faz 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).

Firmicutes (que inclui os gêneros *Streptococcus* e *Veillonella*), Bacteroidetes (que inclui o gênero *Prevotella*) foram os predominantes filos na saliva das mães. Firmicutes e Actinobacteria (que inclui os gêneros *Corynebacterium* e *Actinomyces*) predominantes no biofilme supragingival. Estes resultados corroboram com encontrados por Keijser et al. (2008).

Existem poucos estudos sobre o microbioma de crianças com cárie utilizando técnica cultura-independentes. Assim, no desenvolvimento do estudo, optou-se por realizar a análise por pirosequenciamento das amostras do único bebê que desenvolveu lesão de cárie. A limitação pela inclusão de um caso existe, contudo, esta análise objetivou contribuir com a escassa literatura sobre o assunto. Espécies como *Streptococcus* e *Veillonella* estiveram mais presentes em biofilme de crianças com cárie (Xu et al., 2014). Jiang et al. (2014) relataram que a diversidade de bactérias orais é específica em diferentes status de progressão de cárie. Contraditoriamente, Gomar-Vercher et al. (2014), estudou grupos de crianças com diferentes experiências de cárie por pirosequenciamento. O grupo relatou que não houve claras diferenças entre os microbiomas dos vários grupos, apontando para a dificuldade do estabelecimento da composição bacteriana característica como biomarcador para cáries dentárias. Nossos resultados corroboram os

achados de Gomar-Vercher et al. (2014), já que não foi observado perfil específico relacionado à doença no microbioma do bebê com cárie.

Quando comparamos a microbiota salivar de bebês e mães ao longo do período verificamos que a diversidade de Filos é maior nas mães, porém a presença dos gêneros é muito semelhante, especialmente entre aqueles predominantes. Um grande número de filotipos bacterianos foi compartilhado por crianças saudáveis e suas mães, sugerindo a existência de um núcleo salivar comum do microbioma. Estes resultados corroboram com o estudo de Ling et al. (2013) que em crianças e adultos, a grande maioria das sequências na microbiota salivar pertencia aos gêneros *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Gemella*, *Rothia*, *Granulicatella*, *Fusobacterium*, e *Veillonella*, microrganismos componentes da microbiota normal.

Para a microbiota do biofilme de bebês e mães, observou-se uma riqueza muito maior em relação a Filos e gêneros quando comparados à saliva. Este dado é interessante considerando relato anterior que sugere que o biofilme pode ser amostra mais adequada para estudo da diversidade microbiana quando comparada com a saliva, a qual pode não ser representativa da composição do biofilme dentário (Gomar-Vércher et al., 2014). Com destaque para o Filo Actinobacteria, que aumentou consideravelmente no biofilme do bebê e manteve-se alto em todo o período experimental nas mães. Ainda, merece destaque o Filo Firmicutes que reduziu percentualmente ao longo do período, dando lugar para microrganismos envolvidos com a maturação do biofilme.

Este estudo pretendeu contribuir com o estudo da microbiota bucal, traçando um perfil longitudinal do estabelecimento do microbioma oral em bebês saudáveis. Pretendeu-se ainda estabelecer uma sobreposição dos dados dos bebês com o de suas mães. Ao nível de Filos, observou-se que tanto na saliva como no biofilme Actinobacteria,

Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, TM7 e SR1 estabeleceram-se desde os 6 meses, mantendo-se estável ao longo dos períodos experimentais. Um grande número de filotipos bacterianos foi compartilhado por crianças saudáveis e suas mães, sugerindo a existência de um núcleo salivar comum do microbioma. Ao nível de gêneros, observa-se um aumento notável da variabilidade aos 6 aos 12 meses de idade do bebê, mantendo-se estável a partir deste período. Grande diversidade microbiana foi observada no biofilme dentário dos bebês aos 12 meses, sendo bem superior ao encontrado na saliva. A análise do microbioma do único bebê com cárie não demonstra um perfil microbiano único relacionado à doença, o que reitera a complexa patogênese da cárie dentária e a necessidade de estudos mais aprofundados.

7 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos, conclui-se que:

- a) A eficácia do programa de promoção de saúde bucal para este estudo foi reiterada com a ocorrência de cárie em apenas 1 dos bebês (1,51%) acompanhados durante 24 meses;
- b) A diversidade microbiana da saliva e biofilme dentário dos bebês manteve-se estável em relação ao número de Filos ao longo dos períodos;
- c) Observou-se aumento considerável de gêneros na saliva dos bebês dos 6 meses aos 12 meses de idade do bebê, sendo que esta distribuição se manteve nos demais períodos;
- d) Aos 12 meses, 77 diferentes gêneros fazem parte do microbioma do biofilme dentário do bebê, sendo este número maior quando comparado à saliva;
- e) Existe grande similaridade entre os gêneros predominantes na microbiota salivar e do biofilme das mães e bebês. Um grande número de filotipos bacterianos foi compartilhado por crianças saudáveis e suas mães, sugerindo a existência de um núcleo salivar e de biofilme comum do microbioma;
- f) Não foi observado perfil específico para doença cárie no microbioma do bebê com cárie quando sobreposto ao dos bebês cáries-free.

8 REFERÊNCIAS*

Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol.* 2008;46(4):1407-17.

Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5721-32.

Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chem Acta.* 2006;363(1-2):83-94.

Ahmadian A, Lundeberg J, Nyrén P, Uhlén M, Ronaghi M. Analysis of the p53 tumor suppressor gene by pyrosequencing. *Biotechniques.* 2000;28(1):140-4, 146-7.

American Academy of Pediatric Dentistry. Special issue: reference manual 1994 95. *Pediatr Dent.* 1994-1995;16(7):1-96.

American Dental Association, American Academy of Periodontology. Periodontal screening and recording training program kit. Chicago: American Dental Association and American Academy of Periodontics; 1992.

Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simón-Soro A, Pignatelli M, et al. The oral metagenome in health and disease. *ISME J.* 2012;6(1):46-56.

Bönecker M, Marcenes W, Sheiham A. Caries reductions between 1995, 1997 and 1999 in preschool children in Diadema, Brazil. *Int J Paediatr Dent.* 2002;12(3):183-8.

Brailsford SR, Tregaskis RB, Leftwich HS, Beighton D. The predominant *Actinomyces* spp. isolated from infected dentin active root caries lesions. *J Dent Res.* 1999;78(9):1525-34.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [home page na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bunting RW, Crowley M, Hard DG, Keller M. The prevention of dental caries through the limitation of growth of *Bacillus acidophilus* in the mouth. *J Am Dent Assoc.* 1929;16:224-30.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods.* 2010;7(5):335-6.

Cardoso L, Barros L, Rosing CK, Kramer PF, Costa CC. Comparative analysis of three different diagnostic methods to evaluate carious activity in a community basis. *J App Oral Sci.* 2005;13(2):171-5.

Cariño KMG, Shinada K, Kawaguchi Y. Early childhood caries in Northern Philippines. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 2003;31(2):81-9.

Carvalho RP, Mesquita JS, Bonomo A, Elsas PX, Colombo AP. Relationship of neutrophil phagocytosis and oxidative burst with the subgingival microbiota of generalized aggressive periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24(2):124-32.

Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res.* 1993;Jan;72(1):37-45.

Cephas KD, Kim J, Mathai RA, Barry KA, Dowd SE, Meline BS, et al. Comparative analysis of salivary bacterial microbiome diversity in edentulous infants and their mothers or primary care givers using pyrosequencing. *PLoS One.* 2011;6(8):e23503.

Chhour KL, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *J Clin Microbiol.* 2005;43(2):843-9.

Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T, et al. Microbial risk indicators of early childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5753-9.

Crielaard W, Zaura E, Schuller AA, Huse SM, Montijn RC, Keijser BJ. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. *BMC Med Genomics.* 2011;4(4):22.

Cunha RF, Delbem AC, Percinoto C, Saito TE. Dentistry for babies: a preventive protocol. *ASDC J Dent Child.* 2000;67(2):89-92,82.

Demmer RT, Papapanou PN, Jacobs DR Jr, Desvarieux M. Bleeding on probing differentially relates to bacterial profiles: the oral infections and vascular disease epidemiology study. *J Clin Periodontol*. 2008;35(6):479-86.

Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol*. 2010;192(19):5002-17.

Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B. *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiology*. 2009;155(Pt 7):2116-26.

Dini EL, Holt RD, 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*. 2000;28(4):241-8.

Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(26):11971-5.

Dowd SE, Sun Y, Secor PR, Rhoads DD, Wolcott BM, James GA, et al. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol*. 2008;6(8):43.

Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010;26(19):2460-1.

Fraiz FC, Walter LR. Study of the factors associated with dental caries in children who receive early dental care. *Pesqui Odontol Bras*. 2001;15(3):201-7.

Garcia CA, Ahmadian A, Gharizadeh B, Lundeberg J, Ronaghi M, Nyrén P. Mutation detection by pyrosequencing: sequencing of exons 5 to 8 of the p53 tumour suppressor gene. *Gene*. 2000;253(2):249-57.

Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog*. 2010;6(1):e1000713.

Ge Y, Caufield PW, Fisch GS, Li Y. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* colonization correlated with caries experience in children. *Caries Res*. 2008;42(6):444-8.

Gizani S, Papaioannou W, Haffajee AD, Kawvadia K, Quirynen M, Papagiannoulis L. Distribution of selected cariogenic bacteria in five different intra-oral habitats in young children. *Int J Paediatr Dent*. 2009;19(3):193-200.

Gomar-Vercher S, Cabrera-Rubio R, Mira A, Montiel-Company JM, Almerich-Silla JM. Relationship of children's salivary microbiota with their caries status: a pyrosequencing study. *Clin Oral Investig*. 2014 Feb 15. [Epub ahead of print]

Huber JA, Mark Welch DB, Morrison HG, Huse SM, Neal PR, Butterfield DA, et al. Microbial population structures in the deep marine biosphere. *Science*. 2007;318(5847):97-100.

Ismail AL, Sohn W. The impact of universal access to dental care on disparities in caries experience in children. *J Am Dent Assoc*. 2001;132(3):295-303.

Ismail AL, Sohn W, Tellez M, Willem JM, Betz J, Lepkowski J. Risk indicators for dental caries using the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS). *Community Dent Oral Epidemiol*. 2008;36(1):55-68.

Jiang W, Jiang Y, Li C, Liang J. Investigation of supragingival plaque microbiota in different caries status of Chinese preschool children by denaturing gradient gel electrophoresis. *Microb Ecol*. 2011;61(2):342-52.

Jiang W, Ling Z, Lin X, Chen Y, Zhang J, Yu J, et al. Pyrosequencing analysis of oral microbiota shifting in various caries States in childhood. *Microb Ecol*. 2014;67(4):962-9.

Jiang W, Zhang J, Chen H. Pyrosequencing analysis of oral microbiota in children with severe early childhood dental caries. *Curr Microbiol*. 2013;67(5):537-42.

Jonasson J, Olofsson M, Monstein HJ. Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments. *Apmis*. 2002;110(3):263-72.

Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH, Montijn RC, et al. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res*. 2008;87(11):1016-20.

Klein MI, Flório FM, Pereira AC, Höfling JF, Gonçalves RB. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10):4620-6.

Langae T, Ronaghi M. Genetic variation analyses by pyrosequencing. *Mutat Res*. 2005;573(1-2):96-102.

Law V, Seow WK, Townsend G. Factors influencing oral colonization of mutans streptococci in young children. *Aust Dent J*. 2007;52(2):93-100.

Li Y, Caufield PW, Dasanayake AP, Wiener HW, Vermund SH. Mode of delivery and other maternal factors influence the acquisition of *Streptococcus mutans* in infants. *J Dent Res*. 2005;84(9):806-11.

Li Y, Ge Y, Saxena D, Caufield PW. Genetic Profiling of the Oral Microbiota Associated with Severe Early-Childhood. *J Clin Microbiol*. 2007;45(1):81-7.

Lindquist B, Emilson CG. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. *Caries Res*. 2004;38(2):95-103.

Ling Z, Kong J, Jia P, Wei C, Wang Y, Pan Z, et al. Analysis of oral microbiota in children with dental caries by PCR-DGGE and barcoded pyrosequencing. *Microb Ecol*. 2010;60(3):677-90.

Ling Z, Liu X, Wang Y, Li L, Xiang C. Pyrosequencing analysis of the salivary microbiota of healthy Chinese children and adults. *Microb Ecol*. 2013;65(2):487-95.

Llena C, Fomer L. Dietary habits in a child population in relation to caries experience. *Caries Res*. 2008;42(5):387-93.

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986;50(4):353-80.

Loesche WJ. The specific plaque hypothesis and the antimicrobial treatment of periodontal disease. *Dent Update*. 1992;19(2):68, 70-2, 74.

Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol*. 2003;30(7):644-54.

Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*. 1994;8(2):263-71.

McCabe KM, Khan G, Zhang YH, Mason EO, McCabe ER. Amplification of bacterial DNA using highly conserved sequences: automated analysis and potential for molecular triage of sepsis. *Pediatrics*. 1995;95(2):165-9.

McClure FF, Hewitt WL. The relation of penicillin to induce rat dental caries and oral *Lactobacillus acidophilus*. *J Dent Res*. 1946;25(6):441-3.

Meurman P, Pienihäkkinen K, Eriksson AL, Alanen P. Mutans streptococci colonization associates with the occupation of caretaker, a practise-based study. *Int J Paediatr Dent*. 2010;20(2):144-50.

Meyer M, Stenzel U, Hofreiter M. Parallel tagged sequencing on the 454 platform. *Nat Protoc.* 2008;3(2):267–78.

Milgrom P, Riedy CA, Weinstein P, Tanner AC, Manibusan L, Bruss J. Dental caries and its relationship to bacterial infection, hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6- to 36-month-old children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2000;28(4):295-306.

Misra S, Tahmassebi J, Brosman M. Early childhood caries – a review. *Dent Update.* 2007;34(9):556-8, 561-2, 564.

Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res.* 2009;19(4):636-43.

Nelun Barfod M, Magnusson K, Lexner MO, Blomqvist S, Dahlén G, Twetman S. Oral microflora in infants delivered vaginally and by caesarean section. *Int J Paediatr Dent.* 2011;21(6):401-6.

Nordström T, Nourizad K, Ronaghi M, Nyren P. Method enabling pyrosequencing on double-stranded DNA. *Anal Biochem.* 2000;282(2):186-93.

Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Wagner M, et al. Use of the germfree animal technique in the study of experimental dental caries. I. Basic observations on rats reared free of all microorganisms. *J Dent Res.* 1954;33:147-74.

Packer BN, Valente PHM, Bretz WA. Avaliação de fatores relacionados à transmissão de infecções pelos estreptococos do grupo mutans. *Rev ABO Nac* 1999;7(2):108-13.

Papaioannou W, Gizani S, Haffajee AD, Quirynen M, Mamai-Homata E, Papagiannoulis L. The microbiota on different oral surfaces in healthy children. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24(3):183-9.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 2001;183(12):3770-83.

Pastore J, Silva NV. *Mobilidade Social no Brasil.* São Paulo: Markron; 2000.

Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem.* 2009;55(5):856-866.

Reisine S, Douglass JM. Psychosocial and behavioral issues in early childhood caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1998;26(1 Suppl):32-44.

Roesch LF, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AK, Kent AD. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J*. 2007;1(4):283-90.

Roeters FJ, van der Hoeven JS, Burgersdijk RC, Schaeken MJ. Lactobacilli, mutans streptococci and dental caries: a longitudinal study in 2-year-old children up to the age of 5 years. *Caries Res*. 1995;29(4):272-9.

Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem*. 1996;242(1):84-9.

Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*. 1998;281(5375):363-5.

Ronaghi M, Elahi E. Pyrosequencing for microbial typing. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;25;782(1-2):67-72.

Samaranayake LP. Normal oral flora, the oral ecosystem and plaque biofilms. *Essential microbiology for Dentistry*. Philadelphia: Elsevier; 2006.

Sánchez M, Llama-Palacios A, Blanc V, Leon R, Herrera D, Sanz M. Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodontal Res*. 2011;46(2):252-60.

Seow WK, Lam JH, Tsang AK, Holcombe T, Bird PS. Oral *Streptococcus* species in pre-term and full-term children - a longitudinal study. *Int J Paediatr Dent*. 2009;19(6):406-11.

Sundquist A, Bigdeli S, Jalili R, Druzin ML, Waller S, Pullen KM, et al. Bacterial flora-typing with targeted, chip-based pyrosequencing. *BMC Microbiol*. 2007;7:108.

Thakur R, Singh MG, Chaudhary S, Manuja N. Effect of mode of delivery and feeding practices on acquisition of oral *Streptococcus mutans* in infants. *Int J Paediatr Dent*. 2012;22(3):197-202.

Tankunnasombut S, Youcharoen K, Wisuttisak W, Vichayanrat S, Tiranathanagul S. Early colonization of mutans streptococci in 2- to 36-month-old Thai children. *Pediatr Dent*. 2009;31(1):47-51.

Tanner AC, Milgrom PM, Kent R Jr, Mokeem SA, Page RC, Riedy CA, et al. The microbiota of young children from tooth and tongue samples. *J Dent Res*. 2002;81(1):53-7.

Tanner AC, Kent R Jr, Kanasi E, Lu SC, Paster BJ, Sonis ST, et al. Clinical characteristics and microbiota of progressing slight chronic periodontitis in adults. *J Clin Periodontol*. 2007;34(11):917-30.

Tedjosasongko U, Kozai K. Initial acquisition and transmission of mutans streptococci in children at day nursery. *ASDC J Dent Child*. 2002;69(3):284-8, 234-5.

Tekavec MM, Tekavec CD. PSR provides new patient-management tool. *Dent Econ*. 1993;83(4):69-70, 72,74.

ten Cate. The need for antibacterial approaches to improve caries control. *Adv Dent Res*. 2009;21(1):8-12.

Tiberia MJ, Milnes AR, Feigal RJ, Morley KR, Richardson DS, Croft WG et al. Risk factors for early childhood caries in Canadian preschool seeking care. *Pediatr Dent*. 2007;29:201-8.

Wallace DE. PSR and CPITN charting: the need for documentation in patients records. *J N Z Soc Periodontol*. 1994;(77):23-6.

Wan AK, Seow WK, Purdie DM, Bird PS, Walsh LJ, Tudehope DI. A longitudinal study of *Streptococcus mutans* colonization in infants after tooth eruption. *J Dent Res*. 2003;82(7):504-8.

Wan AK, Seow WK, Purdie DM, Bird PS, Walsh LJ, Tudehope DI. Oral colonization of *Streptococcus mutans* in six-month-old pre-dentate infants. *J Dent Res*. 2001a;80(12):2060-5.

Wan AK, Seow WK, Walsh LJ, Bird P, Tudehope DI, Purdie DM. Association of *Streptococcus mutans* infection and oral developmental nodules in pre-dentate infants. *J Dent Res* 2001b;80(10):1945-8.

World Health Organization. Oral health survey, basic methods. Geneva: World Health Organization; 1997.

World Health Organization. Complementary feeding of young children in developing countries: a review of current scientific knowledge. Geneva: World Health Organization; 1998.

Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiol*. 2009;9:259.

Xu H, Hao W, Zhou Q, Wang W, Xia Z, Liu C, et al. Plaque bacterial microbiome diversity in children younger than 30 months with or without

caries prior to eruption of second primary molars. PLoS One. 2014;9(2):e89269.

Yang F, Zeng X, Ning K, Liu KL, Lo CC, Wang W, et al. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. ISME J. 2012;6(1):1-10.

Yip HK, Guo JH, Wong WH. Incipient caries lesions on cementum by mono and co-culture oral bacteria. J Dent. 2007;35(5):377-82.

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome do Paciente:			
Documento de Identidade n°	Sexo:	Data de Nascimento:	
Endereço:		Cidade:	U.F.
Telefone:		CEP:	

1. Responsável Legal:			
Documento de Identidade n°	Sexo:	Data de Nascimento:	
Endereço:		Cidade:	U.F.
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):			

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. Título do protocolo de pesquisa: “Desenvolvimento da microbiota oral e intestinal de bebês em relação à saúde bucal e geral: análise longitudinal por pirosequenciamento da microbiota de bebês e seus parentes dentro de um Programa de Saúde Bucal para Primeira Infância”.		
2. Pesquisador responsável: Robson Frederico Cunha		
Cargo/função: Prof. Adj. da disciplina de	Inscr.Cons.Regional : 34.432	Unidade ou Departamento do Solicitante: Departamento de Odontologia Infantil e Social
3. Avaliação do risco da pesquisa: (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo). X SEM RISCO <input type="checkbox"/> RISCO MÍNIMO <input type="checkbox"/> RISCO MÉDIO <input type="checkbox"/> RISCO MAIOR <input type="checkbox"/>		
4. Justificativa e os objetivos da pesquisa (explicitar): Justificativa: Definir a microbiota bucal de bebês e como ela se altera com o tempo é de grande importância para ajudar na prevenção, no diagnóstico e no tratamento de doenças bucais num estágio precoce. Objetivos: O objetivo desse estudo é de avaliar a colonização microbiana de crianças atendidas em um programa de saúde bucal para bebês aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade e associar a diversidade microbiana com a dieta, higiene bucal, presença de dentes, prevalência de cárie e condições periodontais em comparação com as condições bucais e diversidade microbiana dos pais ou responsáveis.		
5. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: Em todos os períodos de coleta, os parentes ou responsáveis serão entrevistados para determinar o cumprimento das orientações fornecidas e para avaliação da dieta e higiene bucal dos bebês. A saliva e a placa bacteriana dos pais ou responsável serão coletadas com auxílio de cotonete. No exame clínico será avaliada a gengiva com		

<p>auxílio de um instrumento odontológico. A análise de prevalência de cárie também será avaliada.</p>
<p>6. Desconfortos e riscos esperados: O trabalho a ser realizado não apresenta riscos para a população estudada, já que o mesmo consiste em entrevistas, avaliações da dieta e higiene bucal, coleta de saliva e biofilme, além da avaliação clínica dos tecidos moles e dentes. A participação é voluntária e os dados obtidos mantêm a confiabilidade com a publicação anônima dos dados. Ainda o consentimento poderá ser retirado a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.</p>
<p>7. Benefícios que poderão ser obtidos: O trabalho é de extrema importância, pois vai fornecer aos dentistas informações necessárias para a prevenção de diversas doenças de uma maneira simples, segura e barata.</p>
<p>8. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: Os benefícios do projeto estão relacionados com a inserção do bebê em um Programa de Saúde Bucal para Primeira Infância, que visa acompanhar sua saúde bucal, atendendo suas necessidades e educar pais com relação à importância do cuidado preventivo e da importância de se instituir bons hábitos dietéticos e de higiene.</p>
<p>9. Duração da pesquisa: 2 anos</p>
<p>10. Aprovação do Protocolo de pesquisa pelo comitê de ética para análise de projetos de pesquisa em / /</p>

III - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

<p>1. Recebi esclarecimentos sobre a garantia de resposta a qualquer pergunta, a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento do indivíduo.</p>
<p>2. Recebi esclarecimentos sobre a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação de meu tratamento.</p>
<p>3. Recebi esclarecimento sobre compromisso de que minha identificação se manterá confidencial tanto quanto a informação relacionada com a minha privacidade.</p>
<p>4. Recebi esclarecimento sobre a disposição e o compromisso de receber informações obtidas durante o estudo, quando solicitada, ainda que possa afetar minha vontade em continuar participando da pesquisa.</p>
<p>5. Recebi esclarecimento sobre a disponibilidade de assistência no caso de complicações e danos decorrentes da pesquisa.</p>
<p>Observações complementares.</p>

IV – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido (a) pelo pesquisador, conforme registro nos itens 1 a 6 do inciso III, consinto em participar, na qualidade de paciente, do Projeto de Pesquisa referido no inciso II.

Assinatura

Local, / / .

APÊNDICE B - Ficha clínica utilizada na anamnese e exame clínico dos bebês

Ficha Clínica

Prontuário nº _____

1. Identificação do paciente

Nome: _____

Naturalidade: _____ Estado: _____

Data do Nascimento: ____/____/____ Idade: ____ Meses

Sexo: ____

Pai

Nome: _____

Idade: _____

Profissão: _____

Local de trabalho: _____

Mãe

Nome: _____

Idade: _____

Profissão: _____

Local de trabalho: _____

Responsável

Nome: _____

Idade: _____

Profissão: _____

Local de trabalho: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ CEP: _____

Cidade: _____ Estado: _____

Telefone residencial: _____

Telefones para recado: _____

2. Investigação Diagnóstica da família:

Estado civil dos pais: _____

Paciente vive com: _____

Relaciona-se melhor com: _____

Número de irmãos: () Número de irmãos adotivos: ()

Paciente adotado: () S/N

Número de moradores na mesma casa ()

Escolaridade do pai: _____

Escolaridade da mãe: _____

Renda familiar e nível sócio-econômico: () 1.Acima de 60 SM(Alto) 2.De 35 a 59 SM(Médio superior) 3.De 15 a 34 SM(Médio) 4.De 5 a 14 SM(Médio Inferior) 5.De 3 a 4 SM(Baixo superior) 6.Abaixo de 3 SM(Baixo inferior)

Paciente tratado de forma diferente: () S/N

Participa do contexto social: () S/N

Motivo da consulta: _____

Anamnese

1. História médica pré-natal/nascimento:

Gravidez planejada: () S/N

Número de abortos naturais: ()

Realizou pré-natal: () S/N Tempo gestacional: _____ semanas

Peso ao nascer: _____

Gestação (alterações sistêmicas): _____

Local do parto: _____

Tipo de parto: () Normal () Cesariana () Fórceps

Chorou logo que nasceu: () S/N Nasceu cianótico: () S/N

Dificuldade de sucção: () S/N Hemorragias: () Sim () Não

Ficou em estufa: () Sim () Não Horas: _____

Anomalias congênitas: () Sim () Não Quais: _____

Problemas perinatais: () 1.Parto demasiadamente rápido 2.Parto demasiadamente demorado 3.Compressão pelo cordão umbilical 4.Prematuridade 5.Pós-maturidade 6.Outros _____

2. Infância

Hospitalizações: () S/N

Doenças da infância:

() Sarampo () Caxumba () Catapora () Doenças cardíacas () Reumáticas ()

Hematológicas () Rubéola () Escarlatina () Doenças respiratórias () Renais ()

Hepáticas () Neurológicas

Outras informações: Problemas alérgicos

Data de coleta: Idade do bebê: Código:

1. Amamentação:

Peito: () S/N _____ Início _____ Fim Frequência: () X ao dia

Mamadeira: () S/N _____ Início _____ Fim Frequência: () X ao dia

Conteúdo: _____

Dorme mamando: () S/N _____ Início _____ Frequência: ()

Acorda para mamar: () S/N _____ Início _____ Frequência: () X por noite

Conteúdo: _____

Obs: _____

2. Alimentação:

1. Alimentos pegajosos e ricos em açúcar:

Biscoito, doces, balas, gomas, frutas secas ou cristalizadas, doces que contenham açúcar, mel, geléias, coberturas de sorvete, marmelada, pé de moleque

2. Alimentos contendo açúcar e amido:

Leite com cereais doces, biscoito, produtos de padaria (pão doce, rosca, bolos, docinhos),
chocolate

3. Doces livres de açúcar:

4. Leite adoçado e produtos de uso diário:

Leite com achocolatado, flan, iogurtes e similares, sorvete, leite com açúcar, mel, papinhas doces

5. Leite não adoçado e produtos de uso diário:

Leite puro, sorvete e iogurte sem açúcar, queijo, papinha salgada

6. Líquidos adoçados:

Sucos industrializados, refrigerantes

7. Frutas:

Frutas naturais, sucos naturais

8. Alimentos ricos em amido semi-hidrolisado:

Pães industrializados (bisnaguinha, pão de forma), salgadinhos, batata frita industrializada

9. Alimentos livres de açúcar:

Nozes, castanhas, pão de padaria, massas (macarrão):

3. Higiene

Tipo de higiene: () 1.Escova 2.Gaze 3. Fralda 4.Outros 5.Não realiza

Frequência: () X ao dia

Higiene noturna: () S/N Início da higienização: _____

4. Medicamentos em uso:

() () () ()

1.Antialérgicos 2.Antibióticos 3.Anti-inflamatórios 4.Anti-fúngicos 5.Anti-hemorrágicos 6.Anticonvulsivantes 7.Outros

5. Coleta da saliva**6. Coleta do biofilme****7. Higiene****8. Exame clínico:**

55	75
54	74
53	73
52	72
51	71

61	81
62	82
63	83
64	84
65	85

9. Prevalência de cárie:

Índice ceo-d: () Cariados () Extração indicada () Obturados

Lesões não cavitadas: () Lesões de manchas brancas ativas () Lesões de manchas brancas inativas

10. Avaliação do periodonto

Coloração e textura: _____

Presença de sangramento: () S/N

Inflamação gengival: () S/N

Cálculo dentário: () S/N

APÊNDICE C - Ficha clínica utilizada na anamnese e exame clínico das mães

Ficha Clínica Responsável

Nome do bebê: _____ Prontuário n° _____

1. Identificação

Nome: _____

Naturalidade: _____ Estado: _____

Data do Nascimento: ____/____/____ Idade: _____

Sexo: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ CEP: _____

Cidade: _____ Estado: _____

Telefone residencial: _____

Telefones para recado: _____

2. Anamnese

Informações importantes:

Medicamentos em uso:

() () () ()

1.Antialérgicos 2.Antibióticos 3.Anti-inflamatórios 4.Anti-fúngicos 5.Anti-hemorrágicos
6.Anticonvulsivantes 7.Outros

Data de coleta:

Código:

3. Coleta da saliva

4. Coleta do biofilme

5. Exame clínico:

17 27

16 26

15 25

14 24

13 23

12	22
11	21
31	41
32	42
33	43
34	44
35	45
36	46
37	47

6. Prevalência de cárie: ()

Índice CPO-D: () Cariados () Extraídos () Obturados

Lesões não cavitadas: () Lesões de manchas brancas ativas () Lesões de manchas brancas inativas

7. Avaliação do periodonto

16,17	11	26,27
47,46	31	36,37

APÊNDICE D - Dados clínicos individuais de CPO-D das mães

Tabela 1 – CPO-D das mães aos 6 meses de idade do bebê

(continua)

Prevalência de Cárie=	Cariados	Perdidos	Obturados	MBA	MBI
6	0	0	6	0	0
13	1	0	12	0	0
2	1	0	1	0	0
15	0	0	15	0	0
3	0	1	2	0	0
16	0	0	16	0	0
11	1	1	9	0	0
5	1	0	4	0	0
20	9	0	11	9	0
19	0	3	16	0	0
9	0	0	9	0	0
8	0	0	8	0	0
16	0	2	14	0	0
13	1	0	12	0	0
16	0	0	16	0	0
13	0	0	13	0	0
6	0	0	6	0	0
3	0	0	3	0	0
17	1	0	16	0	0
14	0	4	10	0	0
9	0	0	9	0	0
13	0	1	12	0	0
17	0	0	17	0	0
9	0	0	9	0	0
6	1	1	4	0	0
12	3	1	8	0	0
8	1	0	7	0	0
8	0	0	8	0	0
4	2	0	2	0	0
10	1	2	7	0	0
15	0	2	13	0	0
9	0	2	7	0	0
14	1	1	12	0	0
7	2	0	5	0	0
8	1	0	7	0	0
19	0	3	16	0	0

Tabela 1 – CPO-D das mães aos 6 meses de idade do bebê

(continuação)

Prevalência de Cárie=	Cariados	Perdidos	Obturados	MBA	MBI
7	2	0	5	0	0
8	1	0	7	0	0
19	0	3	16	0	0
1	0	0	1	0	0
5	3	0	2	0	0
16	0	1	15	0	0
8	0	0	8	0	0
16	0	0	16	0	0
11	2	0	9	0	0
14	0	0	14	0	0
10	0	0	10	0	0
19	0	2	17	0	0
13	2	1	10	0	0
4	0	0	4	0	0
3	0	0	3	0	0
21	1	2	18	0	0
14	0	2	12	0	0
9	0	0	9	0	0
9	0	0	9	0	0
2	0	0	2	0	0
4	2	0	2	0	0
3	0	0	3	0	0
5	0	0	5	0	0
11	0	0	11	0	0
4	0	0	4	0	0
11	0	0	11	0	0
8	0	0	8	0	0
8	0	0	8	0	0
14	0	2	12	0	0
8	1	0	7	0	0
11	0	1	10	0	0
14	0	2	12	0	0
6	0	0	6	0	0
12	0	1	11	0	0
10	0	0	10	0	0
13	0	2	11	0	0
7	0	0	7	0	0

Tabela 1 – CPO-D das mães aos 6 meses de idade do bebê

(conclusão)

Prevalência de Cárie=	Cariados	Perdidos	Obturados	MBA	MBI
12	0	0	12	0	0
8	0	0	8	0	0
13	0	0	13	0	0
10	0	0	10	0	0

MBA: Mancha branca ativa; MBI: Mancha branca inativa

Tabela 2 – CPO-D das mães aos 12 meses de idade do bebê

(continua)

Prevalência de Cárie=	Cariados	Perdidos	Obturados	MBA	MBI
6	0	0	6	0	0
13	1	0	12	0	0
15	0	0	15	0	0
3	0	1	2	0	0
16	0	0	16	0	0
11	1	1	9	0	0
5	1	0	4	0	0
20	9	0	11	9	0
9	0	0	9	0	0
8	0	0	8	0	0
16	0	2	14	0	0
13	1	0	12	0	0
16	0	0	16	0	0
13	0	0	13	0	0
6	1	0	5	0	0
3	0	0	3	0	0
14	0	4	10	0	0
9	1	0	8	0	0
13	0	1	12	0	0
17	0	0	17	0	0
9	0	0	9	0	0
6	1	1	4	0	0
12	3	1	8	0	0
8	0	0	7	0	0
8	0	0	8	0	0
5	3	0	2	0	0
10	1	2	7	0	0
15	0	2	13	0	0
9	0	2	7	0	0
14	1	1	12	0	0
7	2	0	5	0	0
8	1	0	7	0	0
19	0	3	16	0	0
1	0	0	1	0	0
5	3	0	2	0	0
16	0	1	15	0	0
8	0	0	8	0	0

Tabela 2 – CPO-D das mães aos 12 meses de idade do bebê
(conclusão)

Prevalência de Cárie=	Cariados	Perdidos	Obturados	MBA	MBI
6	0	0	6	0	0
16	0	0	16	0	0
11	0	0	11	0	0
14	0	0	14	0	0
10	0	0	10	0	0
19	0	2	17	0	0
13	2	1	10	0	0
4	0	0	4	0	0
3	0	0	3	0	0
21	1	2	18	0	0
14	0	2	12	0	0
9	0	0	9	0	0
9	0	0	9	0	0
2	0	0	2	0	0
4	2	0	2	0	0
3	0	0	3	0	0
5	0	0	5	0	0
11	0	0	11	0	0
4	0	0	4	0	0
11	0	0	11	0	0
8	0	0	8	0	0
8	0	0	8	0	0
8	1	0	7	0	0
11	0	1	10	0	0
14	0	2	12	0	0
6	0	0	6	0	0
12	0	1	11	0	0
10	0	0	10	0	0
13	0	2	11	0	0
7	0	0	7	0	0
12	0	0	12	0	0
8	0	0	8	0	0
13	0	0	13	0	0
10	0	0	10	0	0

MBA: Mancha branca ativa; MBI: Mancha branca inativa

Tabela 3 – CPO-D das mães aos 18 meses de idade do bebê

(continua)

Prevalência de Cárie=	Cariados	Perdidos	Obturados	MBA	MBI
13	0	0	13	0	0
15	0	0	15	0	0
3	0	1	2	0	0
16	0	0	16	0	0
11	1	1	9	0	0
5	1	0	4	0	0
20	0	0	20	0	0
9	0	0	9	0	0
8	0	0	8	0	0
16	0	2	14	0	0
13	1	0	12	0	0
16	0	0	16	0	0
6	0	0	6	0	0
3	0	0	3	0	0
14	0	4	10	0	0
9	0	0	9	0	0
13	0	1	12	0	0
17	0	0	17	0	0
9	0	0	9	0	0
12	4	1	7	0	0
8	0	0	8	0	0
8	0	0	8	0	0
5	0	0	5	0	0
10	0	2	8	0	0
15	0	2	13	0	0
9	0	2	7	0	0
14	1	1	12	0	0
7	2	0	5	0	0
8	1	0	7	0	0
17	0	3	14	0	0
1	0	0	1	0	0
5	3	0	2	0	0
16	0	1	15	0	0
8	0	0	8	0	0
16	0	0	16	0	0
11	0	0	11	0	0
14	0	0	14	0	0

Tabela 3 – CPO-D das mães aos 18 meses de idade do bebê

(conclusão)

Prevalência de Cárie=	Cariados	Perdidos	Obturados	MBA	MBI
10	0	0	10	0	0
20	0	2	18	0	0
4	0	0	4	0	0
3	0	0	3	0	0
21	1	2	18	0	0
14	0	2	12	0	0
9	0	0	9	0	0
9	0	0	9	0	0
2	0	0	2	0	0
4	0	0	4	0	0
3	0	0	3	0	0
5	0	0	5	0	0
11	0	0	11	0	0
4	0	0	4	0	0
11	0	0	11	0	0
8	0	0	8	0	0
8	0	0	8	0	0
8	1	0	7	0	0
11	0	1	10	0	0
14	0	2	12	0	0
6	0	0	6	0	0
12	0	1	11	0	0
10	0	0	10	0	0
13	0	2	11	0	0
7	0	0	7	0	0
12	0	0	12	0	0
8	0	0	8	0	0
13	0	0	13	0	0
10	0	0	10	0	0

MBA: Mancha branca ativa; MBI: Mancha branca inativa

Tabela 4 – CPO-D das mães aos 24 meses de idade do bebê

(continua)

Prevalência de Cárie=	Cariados	Perdidos	Obturados	MBA	MBI
13	0	0	13	0	0
15	0	0	15	0	0
3	0	1	2	0	0
16	0	0	16	0	0
11	1	1	9	0	0
5	1	0	4	0	0
20	0	0	20	0	0
9	0	0	9	0	0
8	0	0	8	0	0
16	0	2	14	0	0
13	1	0	12	0	0
16	0	0	16	0	0
6	0	0	6	0	0
3	0	0	3	0	0
14	0	4	10	0	0
9	0	0	9	0	0
13	0	1	12	0	0
17	0	0	17	0	0
9	0	0	9	0	0
8	0	0	8	0	0
8	0	0	8	0	0
5	0	0	5	0	0
10	0	2	8	0	0
9	0	2	7	0	0
14	1	1	12	0	0
7	2	0	5	0	0
8	0	0	8	0	0
17	0	3	14	0	0
5	3	0	2	0	0
16	0	1	15	0	0
8	0	0	8	0	0
11	0	0	11	0	0
14	0	0	14	0	0
10	1	0	9	0	0
20	0	2	18	0	0
4	0	0	4	0	0
3	0	0	3	0	0

Tabela 4 – CPO-D das mães aos 24 meses de idade do bebê
(conclusão)

Prevalência de Cárie=	Cariados	Perdidos	Obturados	MBA	MBI
21	2	2	17	0	0
9	0	0	9	0	0
9	0	0	9	0	0
2	0	0	2	0	0
4	0	0	4	0	0
3	0	0	3	0	0
5	0	0	5	0	0
11	0	0	11	0	0
4	0	0	4	0	0
11	2	0	9	0	0
8	0	0	8	0	0
8	0	0	8	0	0
8	0	0	8	0	0
11	0	1	10	0	0
14	0	2	12	0	0
6	0	0	6	0	0
12	0	1	11	0	0
10	0	0	10	0	0
13	0	2	11	0	0
12	0	0	12	0	0
10	0	0	10	0	0

MBA: Mancha branca ativa; MBI: Mancha branca inativa

APÊNDICE F - Valores obtidos com a extração de DNA (ng/μl), sendo que obtemos uma média de 50 μl do material após extração

Quadro 23 – Valores referentes às extrações de DNA amostras dos bebês

	Amostra	Nome	DNA	Amostra	Nome	DNA
6 meses	Saliva bebê	P- 13 SB 6	110			
	Saliva bebê	P- 18 SB 6	91,4			
	Saliva bebê	P- 45 SB 6	50			
	Saliva bebê	P- 64 SB 6	19,3			
	Saliva bebê	P- 62 SB 6	153			
	Saliva bebê	P- 08 SB 6	83,7	Biofilme do bebê	P 08 BB 6	7,4
12 meses	Saliva bebê	P- 13 SB 12	83,9	Biofilme do bebê	P- 13 BB 12	1,4
	Saliva bebê	P- 18 SB 12	280	Biofilme do bebê	P- 18 BB 12	42,5
	Saliva bebê	P- 45 SB 12	19,1	Biofilme do bebê	P- 45 BB 12	6,8
	Saliva bebê	P- 64 SB 12	84,4	Biofilme do bebê	P- 64 BB 12	1,8
	Saliva bebê	P- 62 SB 12	256	Biofilme do bebê	P- 62 BB 12	29,7
	Saliva bebê	P- 08 SB 12	31,5	Biofilme do bebê	P- 08 BB 12	69,3
18 meses	Saliva bebê	P- 13 SB 18	23	Biofilme do bebê	P- 13 BB 18	4,7
	Saliva bebê	P- 18 SB 18	38,3	Biofilme do bebê	P- 18 BB 18	23,1
	Saliva bebê	P- 45 SB 18	87	Biofilme do bebê	P- 45 BB 18	5,5
	Saliva bebê	P- 64 SB 18	92,9	Biofilme do bebê	P- 64 BB 18	3,6
	Saliva bebê	P- 62 SB 18	63,1	Biofilme do bebê	P- 62 BB 18	15,2
	Saliva bebê	P- 08 SB 18	34,7	Biofilme do bebê	P- 08 BB 18	7,4
24 meses	Saliva bebê	P- 13 SB 24	25	Biofilme do bebê	P- 13 BB 24	2,8
	Saliva bebê	P- 18 SB 24	30,4	Biofilme do bebê	P- 18 BB 24	3,7
	Saliva bebê	P- 45 SB 24	70	Biofilme do bebê	P- 45 BB 24	17
	Saliva bebê	P- 64 SB 24	153	Biofilme do bebê	P- 64 BB 24	3,1
	Saliva bebê	P- 62 SB 24	167,5	Biofilme do bebê	P- 62 BB 24	11,5
	Saliva bebê	P- 08 SB 24	39,4	Biofilme do bebê	P- 08 BB 24	5,1

Quadro 24 – Valores referentes às extrações de DNA amostras das mães

	Amostra	Nome	DNA	Amostra	Nome	DNA
6 meses	Saliva Responsável	P- 13 SR 6	17,7	Biofilme Responsável	P- 13 BR 6	2,6
	Saliva Responsável	P- 18 SR 6	21,4	Biofilme Responsável	P- 18 BR 6	0,7
	Saliva Responsável	P- 45 SR 6	64	Biofilme Responsável	P- 45 BR 6	2,4
	Saliva Responsável	P- 63 SR 6	16,3	Biofilme Responsável	P- 63 BR 6	3
	Saliva Responsável	P- 62 SR 6	18,5	Biofilme Responsável	P- 62 BR 6	1
12 meses	Saliva Responsável	P- 08 SR 6	72,7	Biofilme Responsável	P- 08 BR 6	2
	Saliva Responsável	P- 13 SR 12	34,4	Biofilme Responsável	P- 13 BR 12	7,4
	Saliva Responsável	P- 18 SR 12	25	Biofilme Responsável	P- 18 BR 12	0,5
	Saliva Responsável	P- 45 SR 12	37	Biofilme Responsável	P- 45 BR 12	1
	Saliva Responsável	P- 63 SR 12	18,7	Biofilme Responsável	P- 63 BR 12	3,2
18 meses	Saliva Responsável	P- 62 SR 12	25,5	Biofilme Responsável	P- 62 BR 12	1,1
	Saliva Responsável	P- 08 SR 12	47,4	Biofilme Responsável	P- 08 BR 12	8,5
	Saliva Responsável	P- 13 SR 18	17,8	Biofilme Responsável	P- 13 BR 18	2,8
	Saliva Responsável	P- 18 SR 18	25	Biofilme Responsável	P- 18 BR 18	0,5
	Saliva Responsável	P- 45 SR 18	24,3	Biofilme Responsável	P- 45 BR 18	0,8
24 meses	Saliva Responsável	P- 63 SR 18	26	Biofilme Responsável	P- 63 BR 18	4
	Saliva Responsável	P- 62 SR 18	20,8	Biofilme Responsável	P- 62 BR 18	5,6
	Saliva Responsável	P- 08 SR 18	70,3	Biofilme Responsável	P- 08 BR 18	2,1
	Saliva Responsável	P- 13 SR24	15,6	Biofilme Responsável	P- 13 BR 24	1,1
	Saliva Responsável	P- 18 SR24	17,1	Biofilme Responsável	P- 18 BR 24	0,8
24 meses	Saliva Responsável	P- 45 SR24	47,4	Biofilme Responsável	P- 45 BR 24	1,2
	Saliva Responsável	P- 63 SR24	42,6	Biofilme Responsável	P- 63 BR 24	4,7
	Saliva Responsável	P- 62 SR24	20,7	Biofilme Responsável	P- 62 BR 24	1
	Saliva Responsável	P- 08 SR24	71,3	Biofilme Responsável	P- 08 BR 24	2,6

APÊNDICE G - Descrição de cada MID (*Multiplex Identifiers*) utilizada na amplificação das amostras

Tabela 5 – Descrição das MIDS utilizadas no estudo

(continua)

Nome	LibL-A	Key	barcode	Primer
Bac_FW_MID 1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	ACGAGTGGT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	ACGCTCGACA	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	AGACGCACTC	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	AGCACTGTAG	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	ATCAGACACG	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	ATATCGCGAG	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	CGTGTCTCTA	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	CTCGCGTGTC	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TAGTATCAGC	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TCTCTATGCG	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TGATACGTCT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TCAGCATAGT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	CGAGAGATAC	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	ATACGACGTA	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TCACGTAATA	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 17	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	CGTCTAGTAC	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 18	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TCTACGTAGC	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 19	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TGTACTACTC	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 20	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	ACGACTACAG	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 21	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	CGTAGACTAG	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 22	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TACGAGTATG	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 23	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TACTCTCGTG	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 24	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TAGAGACGAG	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 25	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TCGTGCTCG	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 26	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	ACATACGCGT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 27	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	ACGCGAGTAT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 28	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	ACTACTATGT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 29	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	ACTGTACAGT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 30	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	AGACTATACT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 31	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	AGCGTCGTCT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 32	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	AGTACGCTAT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 33	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	ATAGAGTACT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 34	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	CACGCTACGT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 35	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	CAGTAGACGT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 36	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	CGACGTGACT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 37	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TACACACACT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 38	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TACACGTGAT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 39	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TACAGATCGT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 40	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TACGCTGTCT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 41	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TAGTGTAGAT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC

Tabela 5 – Descrição das MIDS utilizadas no estudo

(conclusão)

Nome	LibL-A	Key	barcode	Primer
Bac_FW_MID 42	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TCGATCACGT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 43	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TCGCACTAGT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 44	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TCTAGCGACT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 45	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TCTATACTAT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_FW_MID 46	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	TCAG	TGACGTATGT	GGATTAGATACCCBRGTAGTC
Bac_R_MID 1	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC	TCAG	ACGAGTGC GTT	TCACGRCACGAGCTGACGAC
Bac_R_MID 9	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC	TCAG	TAGTATCAGCT	TCACGRCACGAGCTGACGAC
Bac_R_MID 10	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC	TCAG	TGATACGTCTT	TCACGRCACGAGCTGACGAC

APÊNDICE H - Foto do gel das amplificações do par 54 (bebê e mãe) em todos os períodos (6, 12, 18 e 24 meses), para exemplificação

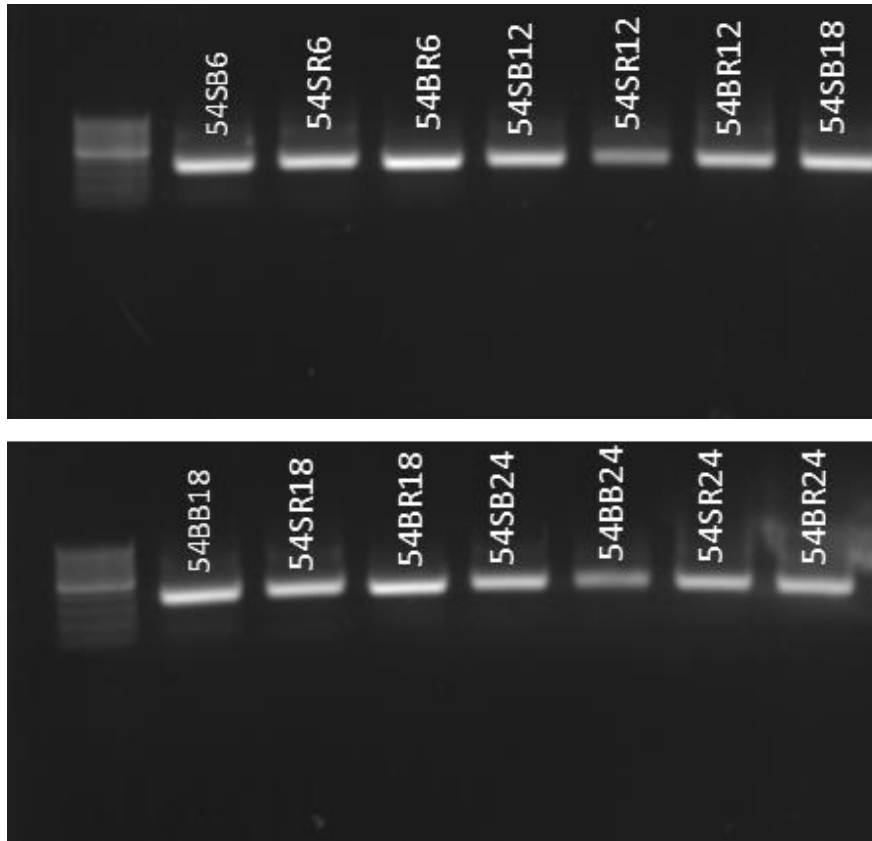


Figura 15 – Amplificações das amostras do par 54 (bebê e mãe)
SB- Saliva do bebê; SR- Saliva do responsável; BB- Biofilme do bebê; BR- Biofilme do responsável

APÊNDICE I - Quantificação das amostras (ng/15µl) após purificação

(continua)

Pool 1

Amostra	Picogreen
54BR12	305.85
54BB24	209.9925
54SB24	179.17
54BR6	472.94
54SB6	660.2675
54SB12	199.5
54SB18	178.8438
54SR24	433.5
54SR12	468.63
54SR6	248.3825
54SR18	396.9375
63SR6	5.646
63SR12	44.36
63SR18	82.5825
63SR24	13.014
62SR6	64.141
62SR12	22.475
62SR18	49.54425
62SR24	3.1615
45SR6	51.8

Pool 2

Amostra	Picogreen
54BR24	183.6
13BR18	5.7089
54BR18	171.626
54BB18	44.3357
08SR12	437.84
13BR24	4.8034
45BR18	119.1352
08SB6	296.478
08SB24	191.4784
08SB18	104.1254
08SR6	158.9509
64SB6	39.25808
64SB12	40.855
64SB18	69.832
64SB24	59.9945
62SB6	53.8005
62SB12	48.81175
62SB18	44.832
62SB24	11.958
45SB6	45.5175

(continuação)

Pool 1

Amostra	Picogreen
45SR12	42.0475
45SR18	85.76175
45SR24	140.2875
13SR6	186.84
13SR12	145.99
13SR18	123.336
13SR24	202.8998
62BB12	129.645
62BB18	194.016
62BB24	80.1453
45BB18	63.497
45BB24	150.3375
45BR6	329.45
45BR12	252.582
45BB12	273.92
45BR24	212.905
63BR6	54.86325
63BR12	130.935
63BR18	240.337
63BR24	53.8175
13BB12	77.2875
13BB18	17.7912

Pool 2

Amostra	Picogreen
45SB12	78.293
45SB18	60.856
45SB24	42.28925
13SB6	185.098
13SB12	131.9455
13SB18	192.1425
13SB24	41.4936
62BR6	132.12
62BR12	106.112
62BR18	69.5976
62BR24	85.995
08BB6	282.8832
08BB12	482.2
08BB18	571.3423
08BB24	469.15
08BR6	453.375
08BR12	393.75
08BR18	476.25
08BR24	512.0225
08SB12	197.5116
08SR18	101.933
08SR24	115.4949

(conclusão)

Pool 1

Amostra	Picogreen
13BB24	219.3688
13BR6	10.35034
13BR12	85.701

Pool 2

Amostra	Picogreen
64BB12	85.59775
64BB18	103.7925
64BB24	101.8024

APÊNDICE J – Ocorrência de gêneros e porcentagem média da amostra de biofilme do bebê 08 aos 6 meses*

Quadro 25 – Dados do biofilme do bebê 08 aos 6 meses de idade

08BB6	
<i>Abiotrophia</i> spp.	0,16
<i>Actinobacillus</i> spp.	0,04
<i>Actinomyces</i> spp.	0,13
<i>Capnocytophaga</i> spp.	4,53
<i>Corynebacterium</i> spp.	0,08
<i>Fusobacterium</i> spp.	0,08
<i>Gemella</i> spp.	0,23
<i>Granulicatella</i> spp.	0,83
<i>Haemophilus</i> spp.	0,06
<i>Lautropia</i> spp.	0,69
<i>Leptotrichia</i> spp.	2,42
<i>Neisseria</i> spp.	2,45
<i>Nesterenkonia</i> spp.	0,01
<i>Porphyromonas</i> spp.	0,19
<i>Rothia</i> spp.	4,47
<i>Streptococcus</i> spp.	59,52
<i>Turicibacter</i> spp.	0,01
<i>Veillonella</i> spp.	4,18

*Porcentagens representativas em negrito.

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos



Declaração

Declaro que o projeto "Desenvolvimento da microbiota oral e intestinal de bebês em relação à saúde bucal e geral: análise longitudinal por pirosequenciamento da microbiota de bebês e seus parentes dentro de um Programa de Saúde Bucal para Primeira Infância" (protocolo FOA 2011-00623), sob a responsabilidade de Robson Frederico Cunha está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Araçatuba, 02 de agosto de 2011.

Prof Adj Alberto Carlos Botazzo Delbem

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos - FOA

Faculdade de Odontologia - UNESP
Departamento de Odontologia Infantil e Social - Odontopediatria
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba - SP
Tel (18) 3636-3314 E-mail: adelbem@foa.unesp.br