

UNIVERSIDADE DE UBERABA  
CAMILLA BEATRIZ DA SILVA

**ESTUDO COMPARATIVO DA PRESENÇA DE *Streptococcus mutans* EM  
AMOSTRAS DE SALIVA E COLOSTRO DE GESTAÇÕES SEM  
INTERCORRÊNCIAS**

Uberaba, MG

2016

CAMILLA BEATRIZ DA SILVA

**ESTUDO COMPARATIVO DA PRESENÇA DE *Streptococcus mutans* EM  
AMOSTRAS DE SALIVA E COLOSTRO DE GESTAÇÕES SEM  
INTERCORRÊNCIAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Odontologia da Universidade de Uberaba, área de concentração Biopatologia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo-Martins

Uberaba, MG

2016

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

S38e Silva, Camilla Beatriz da.  
Estudo comparativo da presença de *Streptococcus mutans* em amostras de saliva e colostro de gestações sem intercorrências / Camilla Beatriz da Silva. – Uberaba, 2016.  
34 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia, 2016.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo-Martins.

1. Streptococcus mutans. 2. Colostro. 3. Saliva. I. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia. II. Título.

CDD 579.355

CAMILLA BEATRIZ DA SILVA

ESTUDO COMPARATIVO DA PRESENÇA DE *Streptococcus mutans* EM  
AMOSTRAS DE SALIVA E COLOSTRO DE GESTAÇÕES SEM  
INTERCORRÊNCIAS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre em Odontologia  
do Programa de Pós-graduação em Odontologia da  
Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Biopatologia

Aprovado (a) em: 19/10/2016

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior  
Universidade de Uberaba

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins  
Universidade de Uberaba

---

Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior  
Universidade Federal do Triangulo Mineiro

## **DEDICATÓRIA**

À Deus, em primeiro lugar sempre, sem Ele nada sou.

Aos meus pais Milton e Sônia, pois de nada adiantaria minha caminhada se vocês não tivessem me ensinado os primeiros passos. Em todo o percurso, vocês estiveram presentes, mostrando-me a importância do estudo para ser uma excelente profissional. Pai, Mãe, vocês são exemplos de vida e essa vitória também é de vocês.

Ao meu marido Rafael pelo apoio, compreensão, amor e incentivo sempre.

A todos os meus familiares que me incentivaram a vencer os desafios.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À minha orientadora Profa. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins, a quem devo agradecer pela amizade, carinho e a confiança na realização do trabalho. Seus ensinamentos, seus conselhos, sua capacidade intelectual e principalmente sua clareza nas orientações sempre foram fatores importantes durante o período de construção desse trabalho. Para sempre serei grata ao seu apoio e cultivarei intenso respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Vinícius Rangel Geraldo Martins, por toda atenção e colaboração no desenvolvimento das pesquisas e a confiança na realização dos trabalhos a mim confiados.

Ao Prof. Dr. Virmondes Rodrigues, por toda atenção e colaboração no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Juan Miguel Rodríguez Gómez e toda sua equipe do PROBISEARCH pela paciência e oportunidade de me receber durante meu estágio na Universidad Complutense de Madrid.

Muito Obrigada!

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade de Uberaba, por meio do Magnífico Reitor Prof. Marcelo Palmério.

À Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Extensão, por meio do Pró-Reitor Prof. Dr. André Luís Teixeira Fernandes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos Professores do Mestrado pelo apoio e ensinamento.

Aos colegas do curso de Mestrado pela convivência e as experiências trocadas.

Aos meus amigos do laboratório Erika, Isabela, Juliana, Marcelly, Maralice, Rayanne e Rodolfo pela colaboração nos procedimentos laboratoriais, pela amizade e os bons momentos que passamos juntos.

À secretaria do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Flávia Michele da Silva pela prontidão em atender.

A todos os funcionários da Universidade Uberaba, agradeço pelo trabalho executado. A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esta dissertação pudesse ser realizada.

A todos, o meu muito obrigada!

## RESUMO

O período neonatal é um momento muito importante para a formação e exposição antigênica do recém-nascido. A boca, por ser a porta de entrada principal do corpo humano, recebe inúmeros micro-organismos de diversas fontes, como por exemplo, pela alimentação. Após o nascimento, a primeira fonte de alimento do neonato é o leite materno que possui inúmeras propriedades imunológicas e nutricionais, mas pouco se sabe sobre a presença da espécie de *Streptococcus mutans* (SM) em recém-nascidos. O objetivo deste estudo foi o de verificar a presença de DNA de SM (SM-DNA) em amostras de colostro (C), saliva do bebê (SB) e comparar com a detecção na saliva de puérperas (SA) de gestações a termo, sem intercorrências e também com dados coletados em questionários. A coleta do material biológico foi realizada após a aprovação do Comitê de Ética. Para tanto, 43 amostras de C, SA e SB foram coletadas logo após a realização do parto. Estas amostras foram imersas em gelo e encaminhadas para os ensaios laboratoriais. Após a extração do DNA das amostras com um kit de extração Powerlyser®, este material foi quantificado e submetidos ao qPCR (PCR quantitativo) com primers específicos para SM. Os resultados mostraram que cerca de 16% das amostras de C apresentaram DNA de SM, não estando correlacionadas com a presença de DNA nas amostras salivares ( $p > 0,05$ ). O DNA de SM foi detectado em 49 e 30% das amostras de SA e SB respectivamente. Houve uma correlação positiva entre detecção DNA de SM na SA e na SB ( $p < 0,05$ ). O tratamento odontológico durante a gestação contribuiu para uma menor prevalência de SM na saliva materna ( $p < 0,005$ ). A escovação de mais de 3 vezes ao dia influenciou na detecção de DNA de SM tanto na SA quanto no C, ou seja, quanto maior a higiene oral menor a possibilidade de detecção de SM-DNA. Os resultados do presente estudo permitiram concluir que SM-DNA pode ser detectado no colostro, possivelmente devido à rota entero-mamária, que também é responsável pelo transporte do SM-DNA para o feto, já que alguns neonatos apresentam detecção positiva na saliva. O tratamento odontológico e hábitos de higiene podem estar correlacionados com a detecção de SM-DNA nas amostras salivares maternas.

**Palavras-chave:** *Streptococcus mutans*, colostro, saliva.



## ABSTRACT

The neonatal period is a very important time for formation and antigenic exposition of the newborn. The mouth may be the main input port of the human body begins to receive several microorganisms from many sources, for example, by feeding. After birth, the first food source of the newborn is breast milk that has numerous immunological and nutritional properties, but little is known about the presence of oral bacteria, such as *Streptococcus mutans* (SM). The aim of this study was to verify the presence of SM DNA in colostrum (C), Baby's saliva (SB) and compare with the detection in Adults Mother's saliva (SA) of pregnancies of mothers at term, uneventfully and with data collected in questionnaires. The collection of biological material was held after the approval of the Ethics Committee. So, 43 samples of C, SA, SB were soon collected after delivery. These samples were immersed in ice and transported to laboratory to analysis. Extraction of DNA was performed with a Powerlyser® extraction kit. The extracted DNA was quantified and the samples submitted to q-PCR with primers specific for SM. The results showed that about 16% of C samples showed SM-DNA detectable, not being correlated with the presence of this DNA in the samples of SA and SB ( $p>0.05$ ). SM was detected in 49 and 30% of samples of SA and SB respectively. There was a positive correlation between the SM detection SA and SB ( $p<0.05$ ). The number of SA samples with SM-DNA detectable was decreased in women that dental treatment during pregnancy ( $p<0.005$ ). The brushing over 3 times daily influenced the SM detection in both the SA and C. The results of this study allow to conclude that SM-DNA can be detected in a minority of colostrum samples as part of the entero-mammary transfer, which is also responsible for SM transport to the fetus, since some newborns have SM-DNA in saliva. The dental treatment and hygiene habits may be related to the detection of SM-DNA in maternal saliva samples.

**Keywords:** *Streptococcus mutans*, colostrum, saliva

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do processo de extração do DNA cromossomal kit PowerLyzer® PowerSoil DNA Isolation.....	19
<b>Figura 2.</b> Curva de Amplificação do qPCR. Representação da especificidade da reação.....	21
<b>Figura 3.</b> Software StepOne®.....	21

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Apresentação do gene, orientação, sequência dos pares de bases e números de bases dos oligonucleotídeos (YANO *et al.*, 2002).. ..... 20
- Tabela 2.** Frequência e porcentagem de amostras com detecção positiva e negativa de SM no C (Colostro), SA (Saliva Materna) e SB (Saliva de bebê) para detecção de DNA de *Streptococcus mutans* (SM)..... 24
- Tabela 3.** Frequência e porcentagem de amostras com detecção positiva e negativa de SM no C (Colostro), SA (Saliva Materna) e SB (Saliva de bebê) de acordo com de acordo com o tratamento odontológico durante a gestação ..... 25
- Tabela 4.** Frequência de detecção positiva e negativa para DNA de SM em amostras de C (colostro) e SA (Saliva materna) e SB (Saliva de bebê) de acordo com o número de escovações durante o dia..... 26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**C:** Colostro.

**CT:** Limiar de ciclo.

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico.

**EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético.

**IgA:** Imunoglobulina A

**MATER HC-FMPR:** Centro de Referência em Saúde da Mulher do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

**qPCR:** Reação em cadeia da polimerase quantitativo.

**SA:** Saliva materna.

**SC:** Sangue do cordão umbilical.

**SM:** *Streptococcus mutans*.

**TRIS-HCL:** Hidroximetil de ácido clorídrico.

**TCLE:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**UNIUBE:** Universidade de Uberaba.

**USP:** Universidade de São Paulo.

**°C:** Grau Celsius.

**cm:** Centímetros.

**mL:** Mililitro

**µL:** Microlitro

**g:** Força centrífuga.

**mM:** Milimolar.

**nm:** Nanômetro.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2 HIPÓTESE</b>	<b>15</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>3.1 GERAL</b>	16
<b>3.2 ESPECÍFICOS</b>	16
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>17</b>
<b>4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO E COLETA AMOSTRAL</b>	17
<b>4.2 DETECÇÃO DE DNA DE SM NAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS</b>	17
<i>4.2.1. Extração de DNA das amostras</i>	17
<i>4.2.2. Quantificação do DNA extraído</i>	19
<i>4.2.3. PCR quantitativo (PCR-q) das amostras</i>	20
<b>5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b>	<b>23</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>24</b>
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>27</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>32</b>
<b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b>	<b>39</b>
<b>ANEXO B – QUESTIONÁRIO</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O leite materno possui variadas propriedades que beneficiam o neonato, principalmente pelos componentes imunológicos que possuem e também como uma importante fonte nutricional (Jeurink *et al.*, 2013; Van Herwijnen *et al.*, 2016). Além dos fatores nutricionais e imunológicos, vários estudos apontam que há uma grande diversidade bacteriana oferecida pelo aleitamento materno (Hunt *et al.*, 2011; Al-Shehri *et al.*, 2015; Boix-Amoros *et al.*, 2016). Já foram descritas, a presença de DNA de estreptococos, estafilococos, bactérias lácticas e bifidobactérias em amostras de leite materno humano (Martin *et al.*, 2007; Collado *et al.*, 2009; Fitzstevens *et al.*, 2016).

As bactérias oferecidas pelo leite materno podem refletir na colonização intestinal de neonatos, pois, crianças amamentadas apresentam uma microbiota intestinal rapidamente dominada por bifidobactéria e torna-se mais diversificada após a suplementação da dieta (Favier *et al.*, 2002; Moodley-Govender *et al.*, 2015) enquanto que crianças alimentadas com fórmulas, o intestino é predominantemente colonizado por gêneros *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Bacteroides* e *Clostridium* (Favier *et al.*, 2002).

A gravidez é um momento único na vida de uma mulher e é caracterizado por mudanças fisiológicas importantes. A grande maioria dos relatos da literatura a respeito da associação entre condição oral materna e gestação, está relacionada aos micro-organismos periodontopatogênicos tais como: *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium* spp, envolvidos em possíveis etiologias de nascimentos prematuros (Paige *et al.*, 1998; Madianos *et al.*, 2001; Scannapieco *et al.*, 2003; Pizzo *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2006; Pretorius *et al.*, 2007; Cong *et al.*, 2016; Hartnett *et al.*, 2016; Mannava *et al.*, 2016).

Nesse contexto, a doença periodontal tem sido associada a diversas condições sistêmicas, dentre elas alterações durante a gestação (Loesche, 1993), determinando um risco para a prematuridade e baixo peso ao nascer (Davenport *et al.*, 2002; Rajapakse *et al.*, 2005; Michalowicz *et al.*, 2006; Offenbacher *et al.*, 2006; Radnai *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2006; Bassani *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2016).

Além destas bactérias associadas a doenças periodontais, outros patógenos orais (Bearfield *et al.*, 2002; Dasanayake *et al.*, 2005; Payne e Bayatibojakhi, 2014; Andonova *et al.*, 2015), incluindo *Streptococcus mutans* (SM) e *Lactobacillus casei*, responsáveis pela doença cárie, podem estar presentes na cavidade amniótica (Morency *et al.*, 2006; Gendrin *et al.*, 2015), mas pouca informação e estudos longitudinais coesos abordam estes micro-organismos. Diferentemente dos micro-organismos periodontais, uma maior colonização por estes micro-

organismos denominados cariogênicos resulta em uma menor incidência de partos prematuros (Dasanayake *et al.*, 2005; Durand *et al.*, 2009; Merglova *et al.*, 2014).

A grande maioria dos estudos com gestantes e micro-organismos orais cariogênicos, especialmente *Streptococcus mutans*, envolve a transmissão destes micro-organismos da mãe para o filho, pois esta representa a principal fonte primária de infecção (Lapirattanakul *et al.*, 2008; Binks e Duane, 2015; Da Silva Bastos *et al.*, 2015). Alguns estudos têm demonstrado que mães com elevadas concentrações de SM salivares, tendem a ter filhos altamente infectados, sendo que as mães pouco colonizadas têm filhos com baixos níveis detectáveis deste micro-organismo (Berkowitz e Jordan, 1975; Rogers, 1977; Kohler *et al.*, 1983; Li e Caufield, 1995; Li *et al.*, 2000; Redmo Emanuelsson e Thornqvist, 2001; Tanzer *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2014).

Ao nascer, o neonato entra em contato com diversos micro-organismos do ambiente. A cavidade oral é a via primária de entrada de bactérias e outros micro-organismos (Berkowitz *et al.*, 1980; Rosenblatt *et al.*, 2015), e alguns destes, embora passem pelas mucosas, não são capazes de colonizá-las (Smith e Taubman, 1992). No entanto, há micro-organismos que se tornam residentes das superfícies mucosas, modificando-a e permitindo o estabelecimento de outros micro-organismos, aumentando a complexidade das comunidades microbianas das mucosas (Marcotte e Lavoie, 1998).

Estreptococos representam a maioria das bactérias que colonizam primeiramente a cavidade bucal, constituindo uma microbiota comensal. Os relatos literários mostram que espécies *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* biovar 1 e *Streptococcus oralis* (Pearce *et al.*, 1995) podem ser detectadas após o nascimento e ao longo do primeiro mês de vida. *Streptococcus mitis* compreenderam a maioria dos estreptococos orais detectáveis em crianças de 1 a 5 meses de idade (Smith e Taubman, 1990). Assim que os dentes começam a erupcionar na cavidade bucal surgem novos sítios de colonização e a microbiota oral torna-se progressivamente mais complexa. A presença de superfícies dentais não descamativas é suficiente para a colonização por vários estreptococos orais, tais como *Streptococcus mutans* (Merglova e Polenik, 2016).

A aquisição inicial por SM pode ocorrer antes deste período da janela de infecção (19-31 meses), quando crianças são expostas a um elevado consumo de sacarose e ao contato com a saliva de indivíduos altamente infectados (Berkowitz *et al.*, 1980; Berkowitz, 2003; Maki *et al.*, 2014; Lynch *et al.*, 2015). As mães parecem ser as principais fontes de infecção por SM das crianças (Li e Caufield, 1995).

A cárie dental é uma doença infecciosa que representa um problema de saúde pública em muitas populações de diferentes países, incluindo o Brasil. *Streptococcus mutans* são os principais micro-organismos envolvidos no desenvolvimento da cárie dental, por reunirem um grupo de fatores que modulam sua capacidade de colonizar as superfícies dentárias e se acumular no biofilme dental, produzindo e tolerando ácidos em quantidades suficientes para promover a desmineralização do esmalte dentário, o que inicia a lesão de cárie (Loesche, 1993; Heilmann *et al.*, 2015). O tratamento restaurador das cavidades dentárias formadas, apesar do alto custo e utilização de materiais melhorados, não interfere na colonização por SM e a doença continua a se desenvolver, resultando na falha das restaurações realizadas, assim como, no desenvolvimento de novas lesões. Processos mais graves ou negligenciados da cárie dental estão associados ainda com a susceptibilidade do hospedeiro a outras doenças sistêmicas como, por exemplo, a endocardite bacteriana (Li *et al.*, 2000).

Estudos prévios revelaram que crianças ao nascimento já apresentavam elevadas quantidades de anticorpos IgA específicos para SM na saliva (Borges *et al.*, 2015) o que aventou a hipótese de que o contato com o micro-organismo ocorre durante a vida intrauterina. Um estudo recente mostrou que, o sangue do cordão umbilical pode conter DNA de SM (Mendes, 2016), o que leva a supor que a estimulação imunológica e o contato do neonato com SM pode ocorrer durante a vida gestacional. Também resultados prévios revelaram que o colostro apresenta níveis elevados de IgA contra SM e seus antígenos de virulência (Petrechen *et al.*, 2015), o que pode proteger o aleitado contra o acúmulo e adesão de SM nas mucosas, mas pouco se sabe sobre os reflexos da amamentação na colonização oral do neonato e o seu desenvolvimento imunológico de mucosas, especialmente contra *Streptococcus mutans*, já que muitos estudos evidenciam a presença de bactérias em colostro humano, daí a importância do presente estudo.



## **2 HIPÓTESE**

O colostro possui DNA de SM detectável tal como as amostras salivares maternas, enquanto que a saliva do neonato não possui tal material genético.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Geral**

O presente estudo buscou analisar a presença e ausência de material genético de SM em amostras colostro de voluntárias de boa saúde geral e comparar com amostras salivares maternas e de neonatos.

### **3.2 Específicos**

- Detectar a frequência de amostras de SA, SB e C positivas para DNA de SM;
- Comparar a detecção do material genético do micro-organismo entre as amostras;
- Associar os dados de detecção de DNA de SM com as informações obtidas em questionário de saúde geral e oral.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Delineamento do estudo e coleta amostral**

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP, ANEXO 1) sob protocolo número 13290/2010, 43 puérperas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP) foram selecionadas. Todas as voluntárias assinaram um termo de consentimento Livre e Esclarecido para sua participação e foram entrevistadas com questionário sobre saúde geral e oral, além de dados socioeconômicos (ANEXO 2). Foram incluídas mulheres de boa saúde geral, gestação sem intercorrências ou alterações fetais e neonatais. Após o parto foi realizada a coleta do colostro através da ordenha manual por enfermeiras do HC-FMRP e em seguidas as salivas não estimuladas foram obtidas por sucção com pipetas graduadas estéreis. Os volumes amostrais foram inseridos em tubos estéreis de poliestireno e imediatamente imersos em gelo. As amostras foram acondicionadas em uma caixa térmica com gelo a 4°C, por duas horas e foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia da Universidade de Uberaba (UNIUBE) para extração do material genético e posteriormente para o Laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro de Uberaba (UFTM), sob orientação do Prof. Dr. Virmondes Rodrigues, para realização dos ensaios de PCR quantitativo.

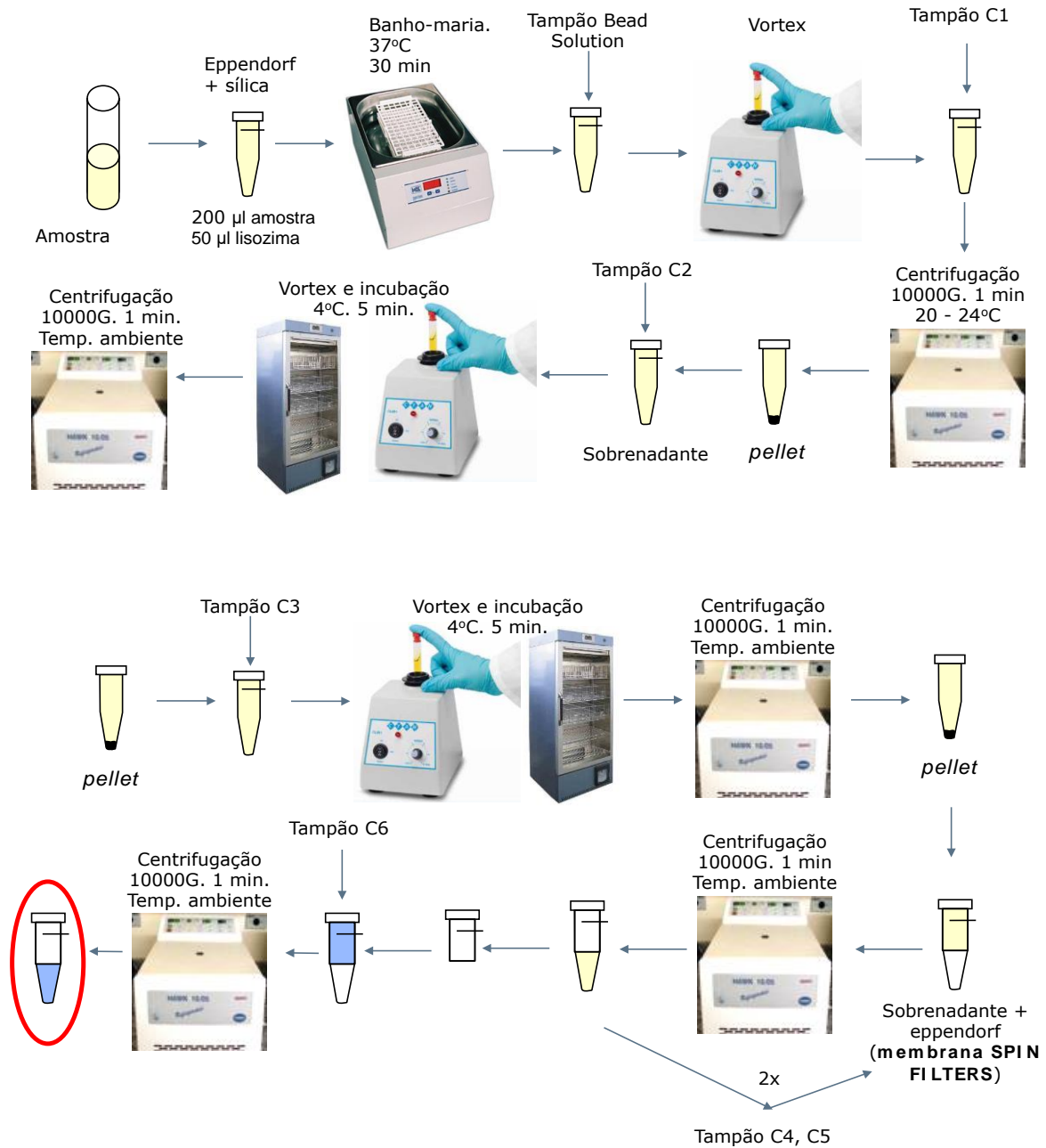
### **4.2 Detecção de DNA de SM nas amostras biológicas**

#### **4.2.1. Extração de DNA das amostras**

Primeiramente, todas as amostras foram tratadas com solução de lisozima para rompimento de parede celular de bactérias gram positivas. A partir de então as amostras foram submetidas à extração do DNA de acordo com o protocolo do fabricante do kit PowerLyzer® PowerSoil DNA Isolation (PROMEGA, Carlsbad, CA) conforme esquematizado na Figura 1. As amostras receberam 750 µL de solução *bead* juntamente com mais 60 µL da solução C1 (auxilia na lise celular) e foram agitadas em vórtex para homogeneização e transferidas para centrifuga a 10.000 xg por 30 segundos em temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo em que foi aplicado 250

$\mu\text{L}$  de solução C2 (remove contaminantes orgânicos e inorgânicos) que foi agitado e incubado a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Após a centrifugação em temperatura ambiente por 1 minuto a  $10.000 \times g$  foi retirado o sobrenadante e adicionado  $200 \mu\text{L}$  de solução C3 (precipita o material orgânico e inorgânico removendo contaminantes). Em seguida, o eppendorf foi levado ao vórtex brevemente e incubado por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram novamente centrifugadas em temperatura ambiente por 1 minuto a  $10.000 \times g$ .

Ao sobrenadante obtido foram adicionados  $1200 \mu\text{L}$  da solução C4 (auxilia na ligação do DNA) e o eppendorf foi levado por 5 segundos ao vórtex. Foram transferidos para um novo eppendorf (Spin Filter)  $675 \mu\text{L}$  do sobrenadante que se formou e o conteúdo foi levado a centrifuga a  $10.000 \times g$  por 1 minuto até que o sobrenadante fosse filtrado através do filtro. O volume filtrado foi desprezado e foram adicionados  $500 \mu\text{L}$  da solução C5 (remove as impurezas facilitando o DNA a se ligar a sílica) e centrifugado a temperatura ambiente durante 30 segundos a  $10.000 \times g$ . Para finalização do processo, o eppendorf foi centrifugado sem nenhum líquido adicional, apenas contendo o material genético aderido à membrana, afim de que o DNA bacteriano pudesse atravessar o filtro, após este passo, o conteúdo genético foi transferido para um novo eppendorf e em seguida adicionado  $100 \mu\text{L}$  da solução C6 (DNA se liga ao elevado teor de sal e é liberado seletivamente) e levado a centrifuga em temperatura ambiente a  $10.000 \times g$  por 30 segundos. Após a centrifugação o filtro foi descartado, o material genético que atravessou a membrana foi preservado, restando ao final do processo  $100 \mu\text{L}$  de DNA pronto para uso.



**Figura 1.** Representação esquemática do processo de extração do DNA cromossomal kit PowerLyzer® PowerSoil DNA Isolation.

#### 4.2.2. Quantificação do DNA extraído

Após extração do DNA das amostras foi realizada a quantificação de material genético extraído bem como seu grau de pureza. Para isto 2 µL da amostra foi analisado em Espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). A pureza das extrações das amostras foi considerada adequada quando razão entre as absorvâncias a 260 nm e 280 nm apresentavam valores entre 1.8 e 2.0. Para valores fora deste

intervalo as extrações foram descartadas e repetidas, já que valores maiores que estes intervalos indicam contaminação por RNA e abaixo sugerem a presença de proteínas (Sambrook e Gething, 1989).

#### 4.2.3. PCR quantitativo (PCR-q) das amostras

Os ensaios de PCR quantitativo das amostras foram realizados em duplicatas e comparados a dois iniciadores que asseguraram a reatividade e/ou negatividade, através da realização dos ensaios com DNA extraído de cepas de *S. mutans* (UA159), como controle positivo e água ultrapura livre de qualquer tipo de DNA, como controle negativo. Para os experimentos foram utilizados os primers de oligonucleotídeos para SM (Extend Biotecnologia Ltda.), como descritos por (Yano et al., 2002) e demonstrado na Tabela 1.

<i>Gene</i>	<i>Orientação</i>	<i>Sequência</i>	<i>Nº de bases</i>
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	<i>Forward</i>	5' AGCCATGCGCAATCAACAGGTT 3'	31
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	<i>Reverse</i>	3' CGCAACGCGAACATCTTGATCAG 5'	32

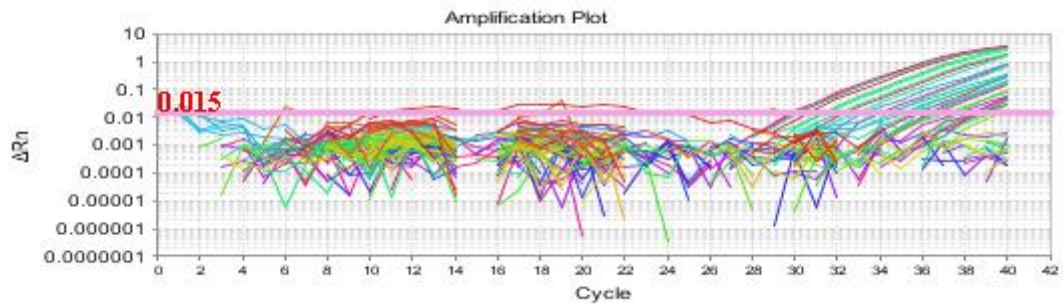
**Tabela 1.** Apresentação do gene, orientação, sequência dos pares de bases e números de bases dos oligonucleotídeos (YANO et al., 2002).

Os oligonucleotídeos foram previamente dissolvidos em TE 1X [10 mM tris-HCL. EDTA 1mM (pH 7.5-8.0)]. Foi utilizado um mix, que continha: 4,5 µL de 1X Sybr green master mix (Roche), 1 µL de cada primer (TABELA 1), 4,5µL de água ultrapura livre de DNA e 2 µL de amostra de DNA cromossomal. Em seguida, este mix foi depositado em uma placa MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (Costar) que foi selada adequadamente, levada para um "speed" de 2 segundos e colocada no termociclador.

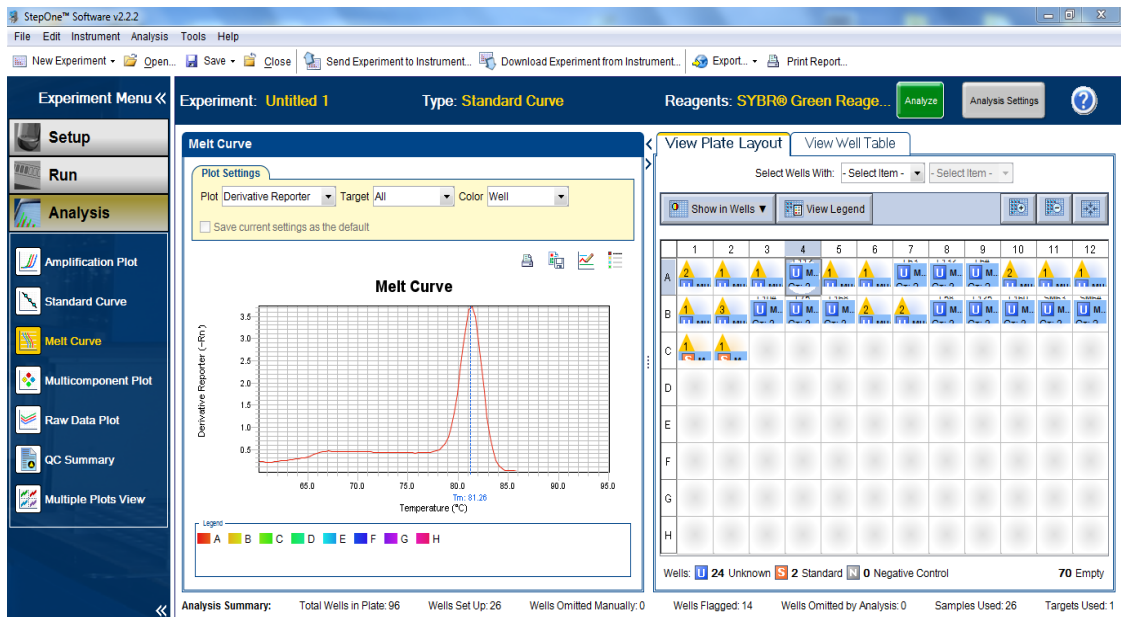
O termociclador utilizado na realização da técnica foi programado para obter uma desnaturação do DNA a uma temperatura de 95°C por um período de 10 minutos, o anelamento ocorreu a 62°C por 20 segundos e o processo de extensão a 68°C por 40 segundos, todo o processo de termo ciclagem se deu em 40 ciclos consecutivos sendo que o ciclo final compreendeu em média o intervalo entre 75°C a 85°C (Yano et al., 2002).

Foram obtidas curvas de MELT, bem como a concentração de DNA de SM obtido em cada amostra (FIGURA 2). Para primeira análise dos dados obtidos por meio dos testes de

q-PCR, considerou-se o limiar do ciclo do threshold (Ct), como sendo o ciclo em que a fluorescência emitida pelo 1X SYBR GREEN foi detectada sobrepondo-se ao *background*.



**Figura 2.** Curva de Amplificação do q-PCR. Representação da especificidade da reação.



**Figura 3.** Software StepOne®.

Os sinais de fluorescências, emitidos pelo 1X Syber Green à medida que o produto é amplificado, são expressos graficamente (sinais de fluorescência versus número de ciclos), como pode ser observado (FIGURA 3), permitindo monitorar em tempo real através do Software StepOne®, a cinética e a eficiência da reação de amplificação, ou seja, esta metodologia permite monitorar o momento em que a fluorescência emitida pelo produto amplificado ultrapassa o limiar de detecção (indicado por  $CT=0.015$  na FIGURA 2). O CT

indica o momento a partir do qual a reação é otimizada (fase exponencial) e o produto amplificado é quantificado.



## **5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os dados foram analisados utilizando o Software BioStat®. As frequências de amostras com positividade para DNA de SM foram comparadas entre si e com os dados obtidos pelo questionário pelo teste do Qui-quadrado ou pelo Teste Exato de Fisher (quando as repetições foram menores que 5). As correlações entre presença de DNA entre as amostras e os dados obtidos pelos questionários foram transformados em escores para análise de correlação de Spearman. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 6 RESULTADOS

### 6.1. Detecção de DNA de SM nas amostras

A análise de detecção de DNA microbiano mostrou que a maioria das amostras de C (84%) e de SB (70%) não tiveram DNA de SM detectável (Tabela 2) enquanto que cerca de metade das amostras de SA apresentaram tal material genético.

Amostra N=43	Frequência de amostras de acordo com a detecção de DNA de SM:	
	Positiva n (%)	Negativa n (%)
Colostro (C)	7 (16) <sup>a</sup>	36 (84) <sup>a</sup>
Saliva Materna (SA)	21 (49) <sup>a</sup>	22 (51) <sup>a</sup>
Saliva Bebê (SB)	13 (30)	30 (70)

*As Letras subscritas representam as diferenças significativas entre as amostras e se diferem significativamente, considerando  $p < 0.05$ , quanto detecção de material genético de SM. <sup>a</sup> Qui-quadrado,  $p < 0.003$ ,  $q = 10.37$*

**Tabela 2.** Frequências e porcentagem de amostras positivas e negativas de C (Colostro), SA (saliva Materna), Saliva do neonato (SB) para detecção de DNA de *Streptococcus mutans* (SM).

As análises comparativas entre a frequência das amostras positivas e negativas mostraram que há diferenças estatisticamente significantes entre o C e a SA, pois a saliva materna apresenta mais SM detectável do que o colostro (Qui-quadrado,  $p < 0.05$ ). Houve uma correlação positiva entre detecção de positiva e negatividade de detecção de DNA-SM entre SB e SA (Spearman,  $p < 0.05$ ,  $r_s = 0.36$ ) em que 10 e 19 pares das amostras salivares tiveram respostas positivas e negativas ao mesmo tempo.

### 6.2. Dados socioeconômicos coletados nas entrevistas e detecção de DNA de SM

Os dados coletados através do questionário mostraram que a maioria das amostras foi extraída de gestantes da raça branca (60.5%), com 2º grau completo (56.4%) e que tiveram parto vaginal (76.8%). Não houve correlação entre a detecção de SM nas amostras de SA ou C com dados obtidos no questionário (Spearman,  $p > 0.05$ ,  $r_s < 0.12$ ).

### 6.3. Dados de saúde oral coletados nas entrevistas e detecção de DNA de SM

A maioria das voluntárias (70%) não fizeram tratamento odontológico durante a gravidez. Acima de 60% das gestantes informaram que visitavam regularmente o dentista e que escovavam os dentes mais de três vezes ao dia. Os resultados da comparação entre as amostras e os dados de saúde oral (TABELA 3) mostraram que o tratamento odontológico ou não durante a gravidez não influencia a positividade ou negatividade de detecção de DNA de SM no C, SB e SA (TABELA 3, Teste de Fisher,  $p > 0.05$ ). Embora as mães que não realizaram tratamento durante a gestação apresentaram mais DNA de SM detectável (69%) do que negativos. Tal diferença não foi estatisticamente significativa (TABELA 3,  $p > 0.05$ ). A ausência de tratamento odontológico durante a gestação fez com que o número de amostras positivas fosse maior em SA, o que aconteceu ao contrário nas amostras de C e SB (TABELA 3 <sup>a,b</sup>  $p < 0.05$ ).

Dados Coletados	C		SA		SB	
	Positiva n=7 n (%)	Negativa n=36 n (%)	Positiva n=21 n (%)	Negativa n=22 n (%)	Positiva n=13 n (%)	Negativa n=30 n (%)
<b>Tratamento odontológico</b>						
<i>Durante a gravidez (n=13)</i>	3 (23)	10 (77)	4 (31)	9 (69)	5 (38)	8 (62)
<i>Sem tratamento (n=30)</i>	4 (13) <sup>a</sup>	26 (87) <sup>a</sup>	17 (57) <sup>a,b</sup>	13 (43) <sup>a,b</sup>	8 (27) <sup>b</sup>	22 (73) <sup>b</sup>

As Letras subscritas representam as diferenças significativas entre as amostras e se diferem significativamente, considerando  $p < 0.05$ , quanto detecção de material genético de SM conforme o tratamento odontológico. <sup>a</sup> Teste de Fisher,  $p = 0.001$ , <sup>b</sup> Qui-quadrado,  $p < 0.001$ ,  $q = 18.47$

**Tabela 3.** Frequência e porcentagem de amostras com detecção positiva e negativa de SM no C (colostro), SA (Saliva Materna) e SB (Saliva de bebê) de acordo com o tratamento odontológico durante a gestação.

A Tabela 4 representa a frequência de detecção de DNA-SM nas amostras de acordo com o número de escovações durante o dia. Não houve diferenças estatisticamente significantes na frequência de detecção de SM em cada amostra de acordo com o número de escovações (Teste de Fisher,  $p > 0.05$ ). Também não houve diferenças estatisticamente

significantes entre o C e SB e SA e SB (Teste de Fisher,  $p > 0.05$ ). Houve diferença estatisticamente significativa na frequência de detecção de DNA-SM quando comparado entre C e SA tanto para escovações de 1 a 2 vezes e acima de 3 escovações no dia (teste Exato de Fisher, <sup>a,b</sup>  $p < 0.01$ ).

Dados Coletados Saúde Oral	C		SA		SB	
	Positiva n	Negativa n	Positiva n	Negativa n	Positiva n	Negativa n
<b>Escovação ao dia</b>						
1 a 2 vezes (n=16)	4 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	6	10
Acima de 3 vezes (n=27)	3 <sup>b</sup>	24 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	16 <sup>b</sup>	7	20

*As Letras subscritas representam as diferenças significativas entre as amostras e se diferem significativamente, considerando  $p < 0.05$ , quanto detecção de material genético de SM conforme o número de escovações durante o dia. <sup>a,b</sup> Teste de Fisher;  $p < 0.01$ .*

**Tabela 4.** Frequência de detecção positiva e negativa para DNA de SM em amostras de C, SB e SA de acordo com o número de escovações durante o dia.

## 7 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou analisar a presença e ausência de material genético de SM em amostras colostro de puérperas de boa saúde geral e comparar com amostras salivares. Os ensaios de PCR quantitativo utilizados foram suficientes para detecção de DNA de SM em todas as amostras, bem como no controle positivo (Cepa de *Streptococcus mutans* UA159). Há de se considerar que a detecção de material genético, com a utilização destes ensaios, não diferencia micro-organismos vivos, bactérias mortas ou rompidas e fragmentos bacterianos. Assim, a detecção positiva não significa que o micro-organismo esteja viável para colonização.

Os resultados do presente estudo permitiram detectar DNA de SM em amostras de C em cerca de 16% das amostras, independente da detecção na SA. O caminho de entrada de bactérias nas glândulas mamárias e leite humano ainda não está claro. Há hipóteses de que as bactérias podem estar nas glândulas mamária por contaminação de fora, ou por dentro através de uma via êntero bacteriana, ou ainda, por uma associação entre ambas às vias (Jost *et al.*, 2015). A contaminação de fora pode ocorrer pelo contato com a pele e transferência da microbiota bucal neonatal durante a amamentação (Ramsay e Hartmann, 2005). Isso pode explicar a predominância no leite humano de *Staphylococcus* e *Streptococcus* que são comensais típicos da microbiota via oral e da pele (Bik *et al.*, 2010; Kong e Segre, 2012) respectivamente. No entanto, a coleta das amostras do presente estudo foi realizada antes da primeira mamada do neonato o que não permite a observação da contaminação durante o aleitamento do bebê.

Uma outra hipótese para explicar a presença de micro-organismos no colostro seria a via êntero bacteriana, em que micro-organismos saem do intestino materno por internalização em leucócitos (como por exemplo, células dendríticas) que migram para a via linfática e a circulação sanguínea, alcançando as glândulas mamárias em lactação (Martin-Sosa *et al.*, 2004; Jost *et al.*, 2014), o que justifica a presença de DNA de *S. mutans* em uma parte das amostras.

Embora o gênero *Streptococcus* seja encontrado de forma abundante no colostro e no leite por vários autores (Jimenez *et al.*, 2008; Cephas *et al.*, 2011; Hunt *et al.*, 2011) a espécie *S. mutans*, investigada no presente estudo, foi pouco encontrada nas amostras de colostro. Uma das razões pode estar relacionada à ausência de contato com a cavidade oral do bebê que poderia contaminar a mama com tal bactéria. Mas também, o processo de translocação

bacteriana da mãe poderia ser mais intenso após o nascimento do neonato quando o estímulo de sucção e liberação hormonal estimularia um maior funcionamento das glândulas mamárias.

A boca é o local do corpo com maior diversidade bacteriana, sendo muito maior que a microbiota da vagina ou do intestino, pois alberga mais de 700 espécies bacterianas identificadas (Parahitiyawa *et al.*, 2010). Existem estudos que confirmem a presença de bactérias orais nos tecidos e substâncias fetais, especialmente as associadas à doença periodontal, tais como *Fusobacterium nucleatum* de mulheres que tiveram partos prematuros (Bearfield *et al.*, 2002; Davenport *et al.*, 2002). No entanto, pouco se sabe sobre bactérias cariogênicas provenientes do nicho oral materno no desenvolvimento imunológico e colonização oral fetal.

Tal como acontece com outras interfaces no nosso corpo, na mucosa oral há uma batalha constante pela integridade do tecido e o sistema imunológico que trabalham para impedir que as bactérias orais invadam os tecidos (Kliman, 2014). Condições orais durante a gestação, como o aumento da permeabilidade gengival, fruto das alterações hormonais, podem contribuir para que ocorra uma bacteremia transitória promovendo o transporte de DNA de SM para a circulação.

Reconhecidamente, SM é um micro-organismo comum na microbiota bucal e está associado à formação da cárie dentária (Loesche, 1993). Como a cárie é uma doença multifatorial, nem sempre o indivíduo que alberga a bactéria na cavidade oral, tem ou está com a doença. SM pode ser um micro-organismo transitório na cavidade bucal, o que justifica a não detecção de DNA de SM nas salivas de 51% das amostras salivares maternas. Das amostras que tiveram DNA de SM detectável na saliva materna, a maioria não apresentou SM no C, ou seja, não houve uma correlação com a presença de DNA de SM. Este resultado mostra que embora a saliva apresente o micro-organismo, nem sempre este entra na circulação e consiga atingir as glândulas mamárias e ser secretado em conjunto com o colostro. Por outro lado, houve detecção do DNA de SM em três amostras de colostro, não tendo correlação com as salivas maternas já que as mesmas não apresentaram detecção para SM, pois os micro-organismos podem ser transitórios na cavidade oral, uma vez que é possível o SM penetrar na gengiva materna que fica mais permeável durante a gestação. Como o nicho de colonização de SM no corpo é a boca, esta não detecção na saliva, pode estar associada a escovação recente ou mesmo pelo SM ser transitório na cavidade oral. Assim sendo e sem excluir estas amostras positivas no leite e não na saliva, cerca de 33% das gestantes que apresentam SM na saliva poderão transferir tal bactéria para o neonato através do leite maduro.

A transferência de micro-organismos de mãe para filho através da amamentação desempenha um papel importante para o desenvolvimento das defesas imunológicas do neonato, em especial contra SM, já que o colostro apresenta níveis elevados de IgA contra SM (Petrechen *et al.*, 2015). Estudos recentes mostraram que salivas de crianças não colonizadas pelo SM podem apresentar IgA contra esta bactéria logo após o nascimento (Borges *et al.*, 2015) sinalizando que a estimulação pode ser durante a vida intrauterina. Além da estimulação imunológica de mucosa durante a vida intrauterina, os resultados do presente estudo, mostram que a transferência de SM na fase fetal pode levar a colonização ou a presença de material genético de SM na boca do neonato, já que 13 amostras de SB apresentaram DNA de SM. Estes dados são inéditos para a literatura, pois SM não foi detectado por *Checkerboard* em salivas de neonatos (Nogueira *et al.*, 2012), mas somente em crianças com 5 a 11 meses de vida (Alves *et al.*, 2009). Isto porque a técnica de PCR foi mais sensível na detecção de mínimas quantidades de DNA microbiano. Interessantemente, há uma correlação positiva entre a presença de SM na saliva materna e do neonato.

Os dados obtidos no questionário fornecem dados importantes a respeito da higiene oral hábitos e a associação com a presença de DNA de SM, especialmente na SA, pois as outras amostras foram em sua maioria negativas para DNA de SM. O tratamento odontológico não influencia a presença de SM no C, o que mostra novamente que a translocação bacteriana deve ocorrer após o nascimento. O tratamento parece influenciar a detecção de SM na saliva materna, ou seja, gestantes que realizaram tratamento odontológico apresentaram uma menor prevalência de SM detectável embora não tenha sido encontrada significância estatística. A ausência de tratamento odontológico fez com que um maior número de amostras de SA apresentasse SM, mas na SB e C foi o oposto, ou seja, houve um maior número de amostras negativas.

Um outro dado importante coletado nas entrevistas esteve relacionado com o número de escovações dos dentes durante o dia. A frequência de detecção de SM, em pacientes que escovavam mais de 3 vezes ao dia foi menor em todas as amostras mas não diferiu estatisticamente. Houve diferença estatisticamente entre o C e SA tanto para 1 a 2 vezes e acima de 3 vezes, ou seja quando a voluntária relata uma pobre higiene há uma menor detecção no C e maior na SA, enquanto que um hábito de escovação maior de três vezes faz com que a detecção negativa seja mais perceptível no colostro.

Diante do exposto, o presente estudo sugere a existência de SM no colostro em algumas amostras como parte da transferência entero-mamária, que também é responsável pelo transporte do SM para o feto, atingindo a cavidade oral pela deglutição do líquido

amniótico, o que justifica a detecção de IgA salivar específico contra SM em neonatos em estudos prévios. Hábitos comportamentais e de higiene podem influenciar a colonização oral materna que se relaciona com o colostro. Provavelmente, a presença de SM no leite materno ocorre principalmente após o nascimento com a estimulação das glândulas mamárias. Sendo assim, medidas de tratamento odontológico e prevenção de cárie durante a gestação e após o nascimento do bebê devem ser empregadas para evitar a transmissão de SM via saliva materna e também pelo leite materno.



## 8 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que:

- A minoria das amostras de colostro (16%) apresentou DNA de SM detectável, enquanto que 48% das amostras de salivas maternas apresentaram tal DNA;
- Trinta por cento das salivas de neonatos apresentaram DNA de SM detectável logo após o nascimento;
- A presença de DNA de SM no colostro não esteve correlacionada com a presença da saliva materna;
- Os dados obtidos sobre saúde oral e hábitos de higiene da mãe pareceram influenciar a detecção de DNA de SM nas amostras salivares maternas e no colostro. Amostras salivares de puérperas que realizaram tratamento odontológico durante a gestação apresentaram menores chances de detecção de DNA-SM. Amostras de colostro e salivas maternas que escovavam mais de três vezes ao dia também apresentaram uma menor detecção de DNA de SM do que naquelas que escovavam um menor número de vezes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AL-SHEHRI, S. S.; KNOX, C. L.; LILEY, H. G.; COWLEY, D. M.; WRIGHT, J. R.; HENMAN, M. G.; HEWAVITHARANA, A. K.; CHARLES, B. G.; SHAW, P. N.; SWEENEY, E. L.; DULEY, J. A. Breastmilk-Saliva Interactions Boost Innate Immunity by Regulating the Oral Microbiome in Early Infancy. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0135047, 2015.
2. ALVES, A. C.; NOGUEIRA, R. D.; STIPP, R. N.; PAMPOLINI, F.; MORAES, A. B.; GONCALVES, R. B.; HOFLING, J. F.; LI, Y.; MATTOS-GRANER, R. O. Prospective study of potential sources of Streptococcus mutans transmission in nursery school children. **J Med Microbiol**, v. 58, n. Pt 4, p. 476-81, Apr 2009.
3. ANDONOVA, I.; ILIEV, V.; ZIVKOVIC, N.; SUSIC, E.; BEGO, I.; KOTEVSKA, V. Can oral anaerobic bacteria cause adverse pregnancy outcomes? **Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)**, v. 36, n. 1, p. 137-43, 2015.
4. AZEVEDO, M. S.; VAN DE SANDE, F. H.; MASKE, T. T.; SIGNORI, C.; ROMANO, A. R.; CENCI, M. S. Correlation between the cariogenic response in biofilms generated from saliva of mother/child pairs. **Biofouling**, v. 30, n. 8, p. 903-9, Sep 2014.
5. BASSANI, D. G.; OLINTO, M. T.; KREIGER, N. Periodontal disease and perinatal outcomes: a case-control study. **J Clin Periodontol**, v. 34, n. 1, p. 31-9, Jan 2007.
6. BEARFIELD, C.; DAVENPORT, E. S.; SIVAPATHASUNDARAM, V.; ALLAKER, R. P. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. **BJOG**, v. 109, n. 5, p. 527-33, May 2002.
7. BERKOWITZ, R. J. Causes, treatment and prevention of early childhood caries: a microbiologic perspective. **J Can Dent Assoc**, v. 69, n. 5, p. 304-7, May 2003.
8. BERKOWITZ, R. J.; JORDAN, H. V. Similarity of bacteriocins of Streptococcus mutans from mother and infant. **Arch Oral Biol**, v. 20, n. 11, p. 725-30, Nov 1975.
9. BERKOWITZ, R. J.; TURNER, J.; GREEN, P. Primary oral infaction of infants with Streptococcus mutans. **Arch Oral Biol**, v. 25, n. 4, p. 221-4, 1980.
10. BIK, E. M.; LONG, C. D.; ARMITAGE, G. C.; LOOMER, P.; EMERSON, J.; MONGODIN, E. F.; NELSON, K. E.; GILL, S. R.; FRASER-LIGGETT, C. M.; RELMAN, D. A. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. **ISME J**, v. 4, n. 8, p. 962-74, Aug 2010.
11. BINKS, C.; DUANE, B. Mother-to-child transmission of Streptococcus mutans. **Evid Based Dent**, v. 16, n. 2, p. 39-40, Jun 2015.

12. BOIX-AMOROS, A.; COLLADO, M. C.; MIRA, A. Relationship between Milk Microbiota, Bacterial Load, Macronutrients, and Human Cells during Lactation. **Front Microbiol**, v. 7, p. 492, 2016.
13. BORGES, M. C.; SESSO, M. L.; ROBERTI, L. R.; DE MENEZES OLIVEIRA, M. A.; NOGUEIRA, R. D.; GERALDO-MARTINS, V. R.; FERRIANI, V. P. Salivary antibody response to streptococci in preterm and fullterm children: a prospective study. **Arch Oral Biol**, v. 60, n. 1, p. 116-25, Jan 2015.
14. CEPHAS, K. D.; KIM, J.; MATHAI, R. A.; BARRY, K. A.; DOWD, S. E.; MELINE, B. S.; SWANSON, K. S. Comparative analysis of salivary bacterial microbiome diversity in edentulous infants and their mothers or primary care givers using pyrosequencing. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23503, 2011.
15. COLLADO, M. C.; DELGADO, S.; MALDONADO, A.; RODRIGUEZ, J. M. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. **Lett Appl Microbiol**, v. 48, n. 5, p. 523-8, May 2009.
16. CONG, X.; XU, W.; JANTON, S.; HENDERSON, W. A.; MATSON, A.; MCGRATH, J. M.; MAAS, K.; GRAF, J. Gut Microbiome Developmental Patterns in Early Life of Preterm Infants: Impacts of Feeding and Gender. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0152751, 2016.
17. DA SILVA BASTOS VDE, A.; FREITAS-FERNANDES, L. B.; FIDALGO, T. K.; MARTINS, C.; MATTOS, C. T.; DE SOUZA, I. P.; MAIA, L. C. Mother-to-child transmission of *Streptococcus mutans*: a systematic review and meta-analysis. **J Dent**, v. 43, n. 2, p. 181-91, Feb 2015.
18. DASANAYAKE, A. P.; LI, Y.; WIENER, H.; RUBY, J. D.; LEE, M. J. Salivary *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 and *Lactobacillus casei* levels predict pregnancy outcomes. **J Periodontol**, v. 76, n. 2, p. 171-7, Feb 2005.
19. DAVENPORT, E. S.; WILLIAMS, C. E.; STERNE, J. A.; MURAD, S.; SIVAPATHASUNDRAM, V.; CURTIS, M. A. Maternal periodontal disease and preterm low birthweight: case-control study. **J Dent Res**, v. 81, n. 5, p. 313-8, May 2002.
20. DURAND, R.; GUNSELMAN, E. L.; HODGES, J. S.; DIANGELIS, A. J.; MICHALOWICZ, B. S. A pilot study of the association between cariogenic oral bacteria and preterm birth. **Oral Dis**, v. 15, n. 6, p. 400-6, Sep 2009.
21. FAVIER, C. F.; VAUGHAN, E. E.; DE VOS, W. M.; AKKERMANS, A. D. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 1, p. 219-26, Jan 2002.
22. FITZSTEVENS, J. L.; SMITH, K. C.; HAGADORN, J. I.; CAIMANO, M. J.; MATSON, A. P.; BROWNELL, E. A. Systematic Review of the Human Milk Microbiota. **Nutr Clin Pract**, Sep 27 2016.

23. GENDRIN, C.; VORNHAGEN, J.; NGO, L.; WHIDBEY, C.; BOLDENOW, E.; SANTANA-UFRET, V.; CLAUSON, M.; BURNSIDE, K.; GALLOWAY, D. P.; WALDORF, K. A.; PILIPONSKY, A. M.; RAJAGOPAL, L. Mast cell degranulation by a hemolytic lipid toxin decreases GBS colonization and infection. **Sci Adv**, v. 1, n. 6, p. e1400225, Jul 17 2015.
24. HARTNETT, E.; HABER, J.; KRAINOVICH-MILLER, B.; BELLA, A.; VASILYEVA, A.; LANGE KESSLER, J. Oral Health in Pregnancy. **J Obstet Gynecol Neonatal Nurs**, v. 45, n. 4, p. 565-73, Jul-Aug 2016.
25. HEILMANN, A.; TSAKOS, G.; WATT, R. G. Oral Health Over the Life Course. In: BURTON-JEANGROS, C.; CULLATI, S., *et al* (Ed.). **A Life Course Perspective on Health Trajectories and Transitions**. Cham (CH), 2015. ISBN 9783319204833
26. 9783319204840.
27. HUNT, K. M.; FOSTER, J. A.; FORNEY, L. J.; SCHUTTE, U. M.; BECK, D. L.; ABDO, Z.; FOX, L. K.; WILLIAMS, J. E.; MCGUIRE, M. K.; MCGUIRE, M. A. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e21313, 2011.
28. JEURINK, P. V.; VAN BERGENHENEGOUWEN, J.; JIMENEZ, E.; KNIPPELS, L. M.; FERNANDEZ, L.; GARSSSEN, J.; KNOL, J.; RODRIGUEZ, J. M.; MARTIN, R. Human milk: a source of more life than we imagine. **Benef Microbes**, v. 4, n. 1, p. 17-30, Mar 1 2013.
29. JIMENEZ, E.; DELGADO, S.; FERNANDEZ, L.; GARCIA, N.; ALBUJAR, M.; GOMEZ, A.; RODRIGUEZ, J. M. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. **Res Microbiol**, v. 159, n. 9-10, p. 595-601, Nov-Dec 2008.
30. JOST, T.; LACROIX, C.; BRAEGGER, C.; CHASSARD, C. Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. **Nutr Rev**, v. 73, n. 7, p. 426-37, Jul 2015.
31. JOST, T.; LACROIX, C.; BRAEGGER, C. P.; ROCHAT, F.; CHASSARD, C. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. **Environ Microbiol**, v. 16, n. 9, p. 2891-904, Sep 2014.
32. KHAN, N. S.; ASHRAF, R. N.; NOOR, S.; MAHMOOD UR, R.; MASHHADI, S. F.; RASHID, Z.; SAJJAD, F.; NAZAR, A. F.; NAZAR, H. S.; SYED, R. Association of Maternal Periodontitis with Low Birth Weight in Newborns in a Tertiary Care Hospital. **J Ayub Med Coll Abbottabad**, v. 28, n. 1, p. 120-5, Jan-Mar 2016.
33. KLIMAN, H. J. Comment on "the placenta harbors a unique microbiome". **Sci Transl Med**, v. 6, n. 254, p. 254le4, Sep 17 2014.

34. KOHLER, B.; BRATTHALL, D.; KRASSE, B. Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in their infants. **Arch Oral Biol**, v. 28, n. 3, p. 225-31, 1983.
35. KONG, H. H.; SEGRE, J. A. Skin microbiome: looking back to move forward. **J Invest Dermatol**, v. 132, n. 3 Pt 2, p. 933-9, Mar 2012.
36. LAPIRATTANAKUL, J.; NAKANO, K.; NOMURA, R.; HAMADA, S.; NAKAGAWA, I.; OOSHIMA, T. Demonstration of mother-to-child transmission of *Streptococcus mutans* using multilocus sequence typing. **Caries Res**, v. 42, n. 6, p. 466-74, 2008.
37. LI, Y.; CAUFIELD, P. W. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. **J Dent Res**, v. 74, n. 2, p. 681-5, Feb 1995.
38. LI, Y.; WANG, W.; CAUFIELD, P. W. The fidelity of mutans streptococci transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among Chinese families. **Caries Res**, v. 34, n. 2, p. 123-32, Mar-Apr 2000.
39. LOESCHE, W. J. Bacterial mediators in periodontal disease. **Clin Infect Dis**, v. 16 Suppl 4, p. S203-10, Jun 1993.
40. LYNCH, D. J.; VILLHAUER, A. L.; WARREN, J. J.; MARSHALL, T. A.; DAWSON, D. V.; BLANCHETTE, D. R.; PHIPPS, K. R.; STARR, D. E.; DRAKE, D. R. Genotypic characterization of initial acquisition of *Streptococcus mutans* in American Indian children. **J Oral Microbiol**, v. 7, p. 27182, 2015.
41. MADIANOS, P. N.; LIEFF, S.; MURTHA, A. P.; BOGGESS, K. A.; AUTEN, R. L., JR.; BECK, J. D.; OFFENBACHER, S. Maternal periodontitis and prematurity. Part II: Maternal infection and fetal exposure. **Ann Periodontol**, v. 6, n. 1, p. 175-82, Dec 2001.
42. MAKI, Y.; SAKAYORI, T.; HIRATA, S.; ISHII, T.; TACHINO, A. Monitoring caries risks before the window of infection and later caries increment: a caries prediction study on rapid detection of *Streptococcus mutans* using monoclonal antibodies. **Bull Tokyo Dent Coll**, v. 55, n. 1, p. 19-23, 2014.
43. MANNAVA, P.; GOKHALE, S.; PUJARI, S.; BISWAS, K. P.; KALIAPPAN, S.; VIJAPURE, S. Comparative Evaluation of C-reactive Proteins in Pregnant Women with and without Periodontal Pathologies: A Prospective Cohort Analysis. **J Contemp Dent Pract**, v. 17, n. 6, p. 480-3, 2016.
44. MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 1, p. 71-109, Mar 1998.
45. MARTIN-SOSA, S.; MARTIN, M. J.; CASTRO, M. D.; CABEZAS, J. A.; HUESO, P. Lactational changes in the fatty acid composition of human milk gangliosides. **Lipids**, v. 39, n. 2, p. 111-6, Feb 2004.

46. MARTIN, R.; HEILIG, G. H.; ZOETENDAL, E. G.; SMIDT, H.; RODRIGUEZ, J. M. Diversity of the Lactobacillus group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. **J Appl Microbiol**, v. 103, n. 6, p. 2638-44, Dec 2007.
47. MENDES, M. **Detection of Streptococcus mutans in umbilical cord blood, peripheral blood and saliva from healthy mothers**. 2016. (Mestrado). Department of Pediatrics, Medical School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil & Uberaba University, Universidade de Uberaba, Uberaba.
48. MERGLOVA, V.; KOBEROVA-IVANCAKOVA, R.; BROUKAL, Z.; DORT, J. The presence of cariogenic and periodontal pathogens in the oral cavity of one-year-old infants delivered pre-term with very low birthweights: a case control study. **BMC Oral Health**, v. 14, p. 109, 2014.
49. MERGLOVA, V.; POLENIK, P. Early colonization of the oral cavity in 6- and 12-month-old infants by cariogenic and periodontal pathogens: a case-control study. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 61, n. 5, p. 423-9, Sep 2016.
50. MICHALOWICZ, B. S.; HODGES, J. S.; DIANGELIS, A. J.; LUPO, V. R.; NOVAK, M. J.; FERGUSON, J. E.; BUCHANAN, W.; BOFILL, J.; PAPAPANOU, P. N.; MITCHELL, D. A.; MATSEOANE, S.; TSCHIDA, P. A.; STUDY, O. P. T. Treatment of periodontal disease and the risk of preterm birth. **N Engl J Med**, v. 355, n. 18, p. 1885-94, Nov 2 2006.
51. MOODLEY-GOVENDER, E.; MULOL, H.; STAUBER, J.; MANARY, M.; COUTSOUDIS, A. Increased Exclusivity of Breastfeeding Associated with Reduced Gut Inflammation in Infants. **Breastfeed Med**, v. 10, n. 10, p. 488-92, Dec 2015.
52. MORENCY, A. M.; RALLU, F.; LAFERRIERE, C.; BUJOLDG, E. Eradication of intra-amniotic Streptococcus mutans in a woman with a short cervix. **J Obstet Gynaecol Can**, v. 28, n. 10, p. 898-902, Oct 2006.
53. NOGUEIRA, R. D.; SESSO, M. L.; BORGES, M. C.; MATTOS-GRANER, R. O.; SMITH, D. J.; FERRIANI, V. P. Salivary IgA antibody responses to Streptococcus mitis and Streptococcus mutans in preterm and fullterm newborn children. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 6, p. 647-53, Jun 2012.
54. OBERMAJER, T.; LIPOGLAVSEK, L.; TOMPA, G.; TREVEN, P.; LORBEG, P. M.; MATIJASIC, B. B.; ROGELJ, I. Colostrum of healthy Slovenian mothers: microbiota composition and bacteriocin gene prevalence. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0123324, 2014.
55. OFFENBACHER, S.; LIN, D.; STRAUSS, R.; MCKAIG, R.; IRVING, J.; BARROS, S. P.; MOSS, K.; BARROW, D. A.; HEFTI, A.; BECK, J. D. Effects of periodontal therapy during pregnancy on periodontal status, biologic parameters, and pregnancy outcomes: a pilot study. **J Periodontol**, v. 77, n. 12, p. 2011-24, Dec 2006.
56. PAIGE, D. M.; AUGUSTYN, M.; ADIH, W. K.; WITTER, F.; CHANG, J. Bacterial vaginosis and preterm birth: a comprehensive review of the literature. **J Nurse Midwifery**, v. 43, n. 2, p. 83-9, Mar-Apr 1998.

57. PARAHITIYAWA, N. B.; SCULLY, C.; LEUNG, W. K.; YAM, W. C.; JIN, L. J.; SAMARANAYAKE, L. P. Exploring the oral bacterial flora: current status and future directions. **Oral Dis**, v. 16, n. 2, p. 136-45, Mar 2010.
58. PAYNE, M. S.; BAYATIBOJAKHI, S. Exploring preterm birth as a polymicrobial disease: an overview of the uterine microbiome. **Front Immunol**, v. 5, p. 595, 2014.
59. PEARCE, C.; BOWDEN, G. H.; EVANS, M.; FITZSIMMONS, S. P.; JOHNSON, J.; SHERIDAN, M. J.; WIENTZEN, R.; COLE, M. F. Identification of pioneer viridans streptococci in the oral cavity of human neonates. **J Med Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 67-72, Jan 1995.
60. PETRECHEN, L. N.; ZAGO, F. H.; SESSO, M. L.; BERTOLDO, B. B.; SILVA, C. B.; AZEVEDO, K. P.; DE LIMA PEREIRA, S. A.; GERALDO-MARTINS, V. R.; FERRIANI, V. P.; NOGUEIRA, R. D. Levels and complexity of IgA antibody against oral bacteria in samples of human colostrum. **Immunobiology**, v. 220, n. 1, p. 142-6, Jan 2015.
61. PIZZO, G.; LA CARA, M.; CONTI NIBALI, M.; GUIGLIA, R. Periodontitis and preterm delivery. A review of the literature. **Minerva Stomatol**, v. 54, n. 1-2, p. 1-14, Jan-Feb 2005.
62. PRETORIUS, C.; JAGATT, A.; LAMONT, R. F. The relationship between periodontal disease, bacterial vaginosis, and preterm birth. **J Perinat Med**, v. 35, n. 2, p. 93-9, 2007.
63. RADNAI, M.; GORZO, I.; URBAN, E.; ELLER, J.; NOVAK, T.; PAL, A. Possible association between mother's periodontal status and preterm delivery. **J Clin Periodontol**, v. 33, n. 11, p. 791-6, Nov 2006.
64. RAJAPAKSE, P. S.; NAGARATHNE, M.; CHANDRASEKRA, K. B.; DASANAYAKE, A. P. Periodontal disease and prematurity among non-smoking Sri Lankan women. **J Dent Res**, v. 84, n. 3, p. 274-7, Mar 2005.
65. RAMSAY, D. T.; HARTMANN, P. E. Milk removal from the breast. **Breastfeed Rev**, v. 13, n. 1, p. 5-7, Mar 2005.
66. REDMO EMANUELSSON, I. M.; THORNQVIST, E. Distribution of mutans streptococci in families: a longitudinal study. **Acta Odontol Scand**, v. 59, n. 2, p. 93-8, Apr 2001.
67. ROGERS, A. H. Evidence for the transmissibility of human dental caries. **Aust Dent J**, v. 22, n. 1, p. 53-6, Feb 1977.
68. ROSENBLATT, R.; STEINBERG, D.; MANKUTA, D.; ZINI, A. Acquired Oral Microflora of Newborns During the First 48 Hours of Life. **J Clin Pediatr Dent**, v. 39, n. 5, p. 442-6, Fall 2015.
69. SAMBROOK, J.; GETHING, M. J. Protein structure. Chaperones, paperones. **Nature**, v. 342, n. 6247, p. 224-5, Nov 16 1989.

70. SCANNAPIECO, F. A.; BUSH, R. B.; PAJU, S. Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes. A systematic review. **Ann Periodontol**, v. 8, n. 1, p. 70-8, Dec 2003.
71. SMITH, D. J.; TAUBMAN, M. A. Effect of local deposition of antigen on salivary immune responses and reaccumulation of mutans streptococci. **J Clin Immunol**, v. 10, n. 5, p. 273-81, Sep 1990.
72. SMITH, D. J.; TAUBMAN, M. A. Ontogeny of immunity to oral microbiota in humans. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 3, n. 1-2, p. 109-33, 1992.
73. TANZER, J. M.; LIVINGSTON, J.; THOMPSON, A. M. The microbiology of primary dental caries in humans. **J Dent Educ**, v. 65, n. 10, p. 1028-37, Oct 2001.
74. VAN HERWIJNEN, M. J.; ZONNEVELD, M. I.; GOERDAYAL, S.; NOLTE-T HOEN, E. N.; GARSSSEN, J.; STAHL, B.; ALTELAAR, A. F.; REDEGELD, F. A.; WAUBEN, M. H. Comprehensive proteomic analysis of human milk-derived extracellular vesicles unveils a novel functional proteome distinct from other milk components. **Mol Cell Proteomics**, Sep 6 2016.
75. XIONG, A. S.; YAO, Q. H.; PENG, R. H.; DUAN, H.; LI, X.; FAN, H. Q.; CHENG, Z. M.; LI, Y. PCR-based accurate synthesis of long DNA sequences. **Nat Protoc**, v. 1, n. 2, p. 791-7, 2006.
76. YANO, A.; KANEKO, N.; IDA, H.; YAMAGUCHI, T.; HANADA, N. Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 217, n. 1, p. 23-30, Nov 19 2002.



## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.usp.br



Ribeirão Preto, 16 de março de 2011

Ofício nº 850/2011  
CEP/MGV

**Prezadas Senhoras,**

O trabalho intitulado **“INFLUÊNCIA MATERNA NO DESENVOLVIMENTO E NA ATIVIDADE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE MUCOSA CONTRA PATÓGENOS ORAIS NO INÍCIO DA VIDA”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 319ª Reunião Ordinária realizada em 14/03/2011 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 13290/2010.

*Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.*

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

  
**DR<sup>a</sup> MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

**RUCHELE DIAS NOGUEIRA**

**PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. VIRGÍNIA PAES LEME FERRIANI(Supervisora)**

Depto. de Puericultura e Pediatria

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário  
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4  
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br  
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

## ANEXO B – Questionário

### QUESTIONÁRIO

Prematuro: Não  Sim

Maternidade: _____	Data: ____/____/____	N <sup>o</sup> . ficha: _____
Nome do bebê: _____		
Nome da Mãe: _____	nasc: ____/____/____	
Nome do Pai: _____	nasc: ____/____/____	
Endereço: _____		
Telefone para contato: _____		

### DADOS MATERNOS

1. Perfil racial: 1. ( ) branco 2. ( ) negro 3. ( ) mulato 4. ( ) amarelo 5. ( ) índio 6. ( ) outros \_\_\_\_\_
2. Grau de instrução da mãe: 1. ( ) sem escolaridade 2. ( ) 1<sup>o</sup> grau completo 3. ( ) 1<sup>o</sup> grau incompleto  
4. ( ) 2<sup>o</sup> grau completo 5. ( ) 2<sup>o</sup> grau incompleto 6. ( ) superior
3. Renda familiar: R\$ \_\_\_\_\_/mês
4. Qual foi o tipo de parto? 1. ( ) cesária 2. ( ) normal
5. Qual o tempo de gestação? \_\_\_\_\_ semanas
6. Complicações durante gravidez? 1. ( ) Sim 2. ( ) Não Se sim, pq?  
\_\_\_\_\_
7. Realizou Pré-Natal? 1. ( ) Sim 2. ( ) Não Se sim, qual número de consultas?  
\_\_\_\_\_
8. Utilizou-se de medicação durante a gestação? 1. ( ) Sim 2. ( ) Não Se sim, o motivo? \_\_\_\_\_
9. Frequenta regularmente o dentista? 1. ( ) Sim 2. ( ) Não Se sim, quando foi a última?  
\_\_\_\_\_
10. Apresenta dor em algum dente? 1. ( ) Sim 2. ( ) Não Qual?  
\_\_\_\_\_
11. Quantas vezes você escova os dentes por dia? ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( ) 4 ou mais
12. Seus dentes sangram durante a higiene? 1. ( ) Sim 2. ( ) Não
13. Possui próteses dentais? 1. ( ) Sim 2. ( ) Não Tipo:  
\_\_\_\_\_

**DADOS DA CRIANÇA RECÉM NASCIDA** dia(s) de vida: \_\_\_\_\_ Idade gestacional: \_\_\_\_\_ semanas

Data nasc.: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Sexo: ( ) F ( ) M Peso: \_\_\_\_\_ Kg Estatura: \_\_\_\_\_ cm

1. Perfil racial: 1. ( ) branco 2. ( ) negro 3. ( ) mulato 4. ( ) amarelo 5. ( ) índio 6. ( ) outros \_\_\_\_\_
2. Amamenta ou amamentou seu filho(a)? 1. ( ) Sim 2. ( ) Não