

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE MATERNO-INFANTIL
MESTRADO ACADÊMICO

PIERRE ADRIANO MORENO NEVES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ACIDOGÊNICO DO LEITE MATERNO EM CRIANÇAS
COM DIFERENTES EXPERIÊNCIAS DE CÁRIE**

São Luís
2010

PIERRE ADRIANO MORENO NEVES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ACIDOGÊNICO DO LEITE MATERNO EM CRIANÇAS
COM DIFERENTES EXPERIÊNCIAS DE CÁRIE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno Infantil da Universidade Federal do Maranhão - Mestrado, para obtenção do título de Mestre em Saúde Materno Infantil.

Orientador(a): Profa. Dra. Cecilia Claudia Costa Ribeiro.

Co-Orientador: Prof. Dr. Valério Monteiro-Neto.

São Luís

2010

Neves, Pierre Adriano Moreno.

Avaliação do potencial acidogênico do leite materno em crianças com diferentes experiências de cárie / Pierre Adriano Moreno Neves. – São Luís, 2010, 62 f.

Impresso por computador (fotocópia).

Orientador(a): Cecília Cláudia Costa Ribeiro.

Mestrado (Dissertação) - Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil, 2010.

1. Cárie dentária – crianças 2. Leite materno 3. Sacarose 4. pH I. Título

CDU 616.314-002-053.2

PIERRE ADRIANO MORENO NEVES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ACIDOGÊNICO DO LEITE MATERNO EM CRIANÇAS
COM DIFERENTES EXPERIÊNCIAS DE CÁRIE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno Infantil da Universidade Federal do Maranhão – Mestrado, para obtenção do Título de Mestre em Saúde Materno Infantil.

A Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública considerou o candidato aprovado em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Cecília Cláudia Costa Ribeiro (Orientadora)
Doutora em Odontologia (Cariologia)
Universidade Federal do Maranhão

Profª Drª Cíntia Pereira Machado Tabchoury (Examinadora)
Doutora em Odontologia (Farmacologia)
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho (Examinador)
Doutor em Química Analítica
Universidade Federal do Maranhão

Profª Drª Cláudia Maria Coêlho Alves (Examinadora)
Doutora em Odontologia (Dentística)
Universidade Federal do Maranhão

Dedico este trabalho aos meus pais João Neves e Maria Lucinda por sempre demonstrarem que o conhecimento é o verdadeiro caminho do crescimento em todas as suas nuances.

AGRADECIMENTOS

A essa energia superior que se chama DEUS, por estar sempre e verdadeiramente ao meu lado.

À Prof.^a Dr.^a. Cecília Claudia Costa Ribeiro por tanta confiança e estímulo. Obrigado pelas oportunidades, pelos ensinamentos, pelo exemplo a ser seguido do ser orientadora. Agradeço ainda pelo incentivo dado, pela inestimável orientação e contribuição à minha formação pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Valério Monteiro-Neto pela receptividade, orientação e ensinamentos sempre oferecidos na área de Microbiologia.

Ao Curso de Pós-Graduação em Saúde Materno Infantil – Mestrado da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), na pessoa da Prof.^a Dr.^a Luciane Maria de Oliveira Brito.

À Helena Ribeiro, secretária do Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil, pela sua competência, profissionalismo e prontidão em ajudar.

À grande amiga Prof.^a Mestre Ana Margarida Melo Nunes, pelo período compartilhado na Clínica de Odontopediatria e no Laboratório de Pesquisa. Agradeço pela paciência, compreensão e estímulo sempre oferecidos.

Aos pesquisadores e companheiros do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, em especial, Prof.^a Mestre Silvana Amado Libério, Prof.^a Mestre Rubenice Amaral da Silva e Prof. Mestre Afonso Abreu pela amizade, colaboração, disposição e ajuda sempre oferecida.

A Jefferson Douglas Gonçalves de Lima, exemplo de companheirismo, dedicação e verdadeira amizade.

Ao bolsista de iniciação científica Igor Vasconcelos e ao técnico do laboratório de pesquisa Ivaldo da Silva Alves Filho, por terem compartilhado em algum momento das dificuldades desta pesquisa e terem me ajudado a vencer este desafio.

Aos amigos da turma da 4ª turma de Mestrado em Saúde Materno-Infantil, pela troca de experiências, aprendizado e amizade.

A todos os meus queridos voluntários que tornaram possível este trabalho.

Às instituições responsáveis pelo financiamento desta pesquisa: FAPEMA, PPSUS, CNPq\DECIT- Ministério da Ciência e Tecnologia, CAPES - PROCAD

À todos os amigos, colegas e pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

"O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece."

Benjamin Disraeli

RESUMO

Tendo em vista que amamentação após 1 ano de idade tem sido apontada por alguns estudos como fator de risco à cárie de estabelecimento precoce (CEP), e que é desconhecido se o leite materno é metabolizado em um biofilme oral maduro em crianças com cárie precoce, levando a quedas de pH, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial acidogênico do leite no biofilme oral de lactentes não exclusivos com ou sem experiência de cárie, tendo como controle positivo a sacarose. Medidas de pH do biofilme foram realizadas in vivo em 16 crianças (média de 35,2 meses de idade) divididas em dois grupos: livre de cáries (n=9) e com cárie de estabelecimento precoce (CEP) (n=7). Nos dois grupos foram coletadas amostras de saliva e biofilme para avaliação microbiológica. A acidogênicidade no biofilme oral foi avaliada de forma cruzada após amamentação ou gotejamento de solução de sacarose 10% nos dois grupos de crianças através de medições de pH (pH Descanso, pH_{30min}, pH_{5min}, variação de pH em 5 minutos e AUC_{6.5}) usando-se um microeletrodo de contato. Uma maior contagem de *Streptococcus mutans* foi encontrado no biofilme das crianças com CEP (p<0,05). Na comparação entre crianças com ou sem cárie, o tratamento leite não apresentou nenhuma diferença para nenhuma das variáveis de pH, porém a sacarose provocou um maior $\Delta\text{pH}_{5\text{min}}$ no biofilme dos pacientes com CEP (p=0,0317). Dentro de um mesmo grupo, a sacarose provocou uma maior queda de pH que o leite humano no biofilme de pacientes livre de cáries (p=0,0423). Para os indivíduos CEP, a solução de sacarose também apresentou um potencial acidogênico maior que o leite para as variáveis pH_{5min} (p=0,0308), $\Delta\text{pH}_{5\text{min}}$ (p=0,018) e AUC_{6.5} (p=0,0104). O leite humano não teve potencial acidogênico no biofilme oral de crianças amamentadas, independente da atividade da doença cárie. Em conjunto, esses dados dão suporte a hipótese de que o leite humano não seja cariogênico, e que o consumo de outros carboidratos deve ser avaliado em crianças amamentadas com cárie precoce.

Palavras-chave: Cárie Dentária, Leite materno, Sacarose, pH.

ABSTRACT

Given that breastfeeding after 1 year old has been reported by some studies as a risk factor for early childhood caries (ECC), and it is unknown whether breast milk is metabolized in a structured oral biofilm in children with ECC leading to pH drops, the objective of this study was to evaluate the milk acidogenic potential in oral biofilm of non-exclusive infants with and without caries, using sucrose as a control. Biofilm pH measurement were performed in vivo in 16 children (average 35.2 months) divided into two groups: caries-free (n = 9) and early childhood caries (ECC) (n = 7). In both groups, samples of saliva and plaque were collected for microbiological evaluation. The acidogenicity of oral biofilm was evaluated in a cross shape after breastfeeding or exposure to 10% sucrose solution in both groups of children through measurements of pH (resting pH, pH_{30min}, pH_{5min}, pH variation in 5 minutes and AUC_{6.5}) using a touch microelectrode. Higher counts of mutans streptococci was found in biofilm of children with ECC (p<0.05). Comparing children with or without caries, milk treatment showed no difference for the variables of pH, but sucrose caused a greater $\Delta\text{pH}_{5\text{min}}$ in biofilm of children with ECC (p=0.0317). Within a group, sucrose caused a greater pH drop in the biofilm of caries-free patients than human milk (p=0.0423). For individuals ECC, the sucrose solution also showed a greater acidogenic potential than milk for the variables pH_{5min} (p=0.0308), $\Delta\text{pH}_{5\text{min}}$ (p=0.018) and AUC_{6.5} (p=0.0104). Human milk had no acidogenic potential in oral biofilm of breastfed children, regardless of caries activity. Together, these data support the hypothesis that human milk is not cariogenic, and that the consumption of other carbohydrates should be considered in breastfed infants with early childhood caries.

Keywords: Dental Caries, Breast Milk, Sucrose, pH.

LISTA SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection.
AAPD	American Academy of Pediatric Dentistry (Academia Americana de Odontologia Pediátrica)
AUC6.5	Área sobre a curva de pH 6.5
BHI	Brain Heart Infusion (infusão de cérebro e coração).
cm	Centímetros.
CEP	Cárie de Estabelecimento Precoce
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CPP	Caseinofosfopeptídeos
ceo-d	Dentes decíduos cariados, com extração indicada ou obturados.
dNTP	Trifosfatos de desoxirribonucleotídeos.
EGM	Estreptococos grupo mutans.
<i>et al.</i>	E outros (abreviatura de “ <i>et alii</i> ”).
g	Gramas.
GbpB	Proteína ligante de glucano – B
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
L	Litro.
min	Minuto.
mL	Mililitro.
mM	Milimolar.
MS	Ministério da Saúde
MSB	Ágar <i>mitis salivarius</i> acrescido de bacitracina.
n	Número.
NIDCR	National Institute of Dental and Craniofacial Research
°C	Grau Celsius.
OMS	Organização Mundial da Saúde.
OPAS	Organização Pan Americana da Saúde
OSCN ⁻	íon hipotiocianato
p	Nível de significância estatística.
pb	Pares de base.
pCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono.
PCR	Sigla em inglês de Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).
pH	Potencial hidrogeniônico.
pHdescanso	pH no tempo inicial

pH5min	pH após 5 minutos
pH final	pH após 30 minutos
Δ pH5min	Variação de pH em 5 minutos
<i>Primers</i>	Oligonucleotídeo que inicia uma reação de polimerização a partir de sua hibridização com a cadeia molde à qual é complementar.
r.p.m.	Rotações por minuto.
SCN ⁻	íon tiocianato
seg	Segundo.
Spap	Adesinas de superfície dos <i>Streptococcus mutans</i>
Swab	Dispositivo esterilizado utilizado para realização de coletas.
<i>Taq</i> DNA	polimerase isolada de <i>Termus aquaticus</i> .
U	Unidade (s).
U/L	Unidades por litro.
UNICEF	United Nations Children's Fund (Fundo das Nações Unidas para a Infância)
UFC	Unidades formadoras de colônia.
μ g/mL	Microgramas por mililitro.
%	Porcentagem.
μ L	Microlitros.
μ M	Micromolar.

LISTA DE TABELAS

	p
Tabela 1: Comparação da microbiota entre os grupos livre de cárie e CEP (Média±DP) nas amostras de biofilme e saliva.....	60
Tabela 2: Comparação entre pH Descanso, pH Final, pH _{5min} , ΔpH _{5min} e AUC _{6.5} (Média ± DP) para os tratamentos com leite humano e sacarose nos dois grupos.....	61

LISTA DE GRÁFICOS

		p
Gráfico 1:	Curvas obtidas das médias de pH do biofilme dental com sacarose e leite humano nos grupos livre de cáries e CEP.....	62

SUMÁRIO

	p
1 INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3 OBJETIVOS.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Aspectos Éticos	24
4.2 Caracterização do estudo e amostragem.....	24
4.3 Critérios de avaliação.....	25
4.3.1 Avaliação da dieta e hábitos de higiene oral.....	25
4.3.2 Acidogenicidade do Biofilme Oral.....	25
4.3.3 Procedimentos Microbiológicos.....	26
4.3.4 Análise estatística.....	29
5 RESULTADOS.....	30
REFERÊNCIAS.....	31
ANEXO.....	37
APÊNDICES.....	39
6 ARTIGO CIENTÍFICO.....	44
6.1 Classificação Qualis do periódico na área de Medicina II.....	44
6.2 Normas editoriais.....	44
6.3 Artigo completo.....	51

1 INTRODUÇÃO

O conceito de cárie de estabelecimento precoce (CEP) foi designado para descrever a presença de uma ou mais lesões de cárie em crianças até 71 meses, sendo acrescentado o termo “severa”, para se referir a um quadro agudo e progressivo da doença, quando manifestada antes dos 3 anos de idade, segundo o *National Institutes of Health* (DRURY et al., 1999).

Recentemente, estudos epidemiológicos publicados em periódicos de grande impacto na literatura odontológica têm sugerido uma associação entre cárie de estabelecimento precoce e aleitamento materno noturno ou à livre demanda após um ano de idade (LI; WANG; CAUFIELD, 2000; AZEVEDO; BEZERRA; TOLEDO, 2005; VAN PALENSTEIN HELDERMAN; SOE; VAN’T HOF, 2006). Nesse sentido, a *American Academy of Pediatric Dentistry* (AAPD) tem se posicionado contra o aleitamento materno à livre demanda após a erupção do primeiro dente decíduo, por acreditar que exista um risco potencialmente alto para a formação de lesões de cárie de estabelecimento precoce (AAPD, 2008).

Por outro lado, a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza que o aleitamento materno seja mantido de forma exclusiva até o sexto mês de vida da criança e complementado de forma segura e nutricional com alimentos sólidos até os 2 anos ou mais (OMS/UNICEF, 2003). Não há de se discutir acerca dos benefícios do aleitamento materno, que proporciona nutrição adequada, imunidade e menor incidência de doenças (VALDES; SÁNCHEZ; LABBOK, 1996; OMS/UNICEF, 2003). Benefícios adicionais também são relatados para a saúde bucal tais como: redução do risco de má-oclusão, colapso das formas faciais e redução do risco de apnéia obstrutiva durante o sono (PALMER, 1999).

Diversos estudos ao redor do mundo têm mostrado que a prevalência de lesões de cárie de estabelecimento precoce é maior numa população com baixa renda, apontando o nível sócio econômico como um fator modificador da expressão da doença cárie numa população (KING; WU II; TSAI, 2003; ROSENBLATT; ZARZAR, 2004; AZEVEDO; BEZERRA; TOLEDO, 2005; CHIBINSK; WAMBIER, 2005; VAN PALENSTEIN HELDERMAN; SOE; VAN’T HOF, 2006). Estas populações carentes são as que mais necessitam de ações governamentais direcionadas ao combate da desnutrição, dentre elas, o estímulo a esse aleitamento materno até os dois anos de vida ou mais (OPAS, 2002).

A associação de aleitamento materno e cárie precoce não é consenso na literatura. Revisões sistemáticas sugerem uma relação questionável dessas variáveis (SINTON et al., 1998; RIBEIRO, RIBEIRO, 2004).

Refutando a hipótese de que o leite humano seja cariogênico, dados antropológicos em civilizações pré-históricas, nas quais a amamentação prolongada era prática freqüente,

mostram uma prevalência da doença variando de 0.2% a 1.4% em crianças na dentição decídua (TORNEY, 1992, PALMER, 1999). Ademais, evidências científicas *in situ* e *in vitro* mostram que o leite materno não tem potencial cariogênico quando usado como única fonte de carboidrato da dieta e que bactérias do biofilme oral metabolizam o leite humano sem levar a quedas importantes de pH (ARAÚJO et al., 1997; ERICKSON; MAZHARI, 1999). Mostram ainda que a lactose, após um período de adaptação do biofilme, pode sofrer metabolismo e iniciar a formação de ácidos na placa dental, porém com quedas de pH bem inferiores a glicose (BIRKHED; IMFELD; EDWARDSSON, 1993).

Entretanto, a prática de aleitamento está normalmente associada à utilização de carboidratos fermentáveis, principalmente a sacarose, que normalmente são introduzidos na dieta da criança aos 6 meses de idade, ou mesmo mais precocemente (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; NIQUINI et al., 2009). A freqüente exposição a carboidratos fermentáveis está relacionada a uma mudança no biofilme dental, com seleção de bactérias acidogênicas e acidúricas, tais como *Streptococcus mutans* e lactobacilos (MARSH, 2006).

A sacarose é considerada o carboidrato mais cariogênico porque além de ser fermentado a ácido, ele também é um substrato para produção de polissacarídeos extracelulares no biofilme dental (RØLLA, 1989), que por sua vez aumentam a adesão de novas bactérias ao biofilme em crescimento e aumentam a porosidade da matriz, permitindo a difusão de substratos fermentáveis para o interior deste biofilme (TENUTA et al., 2006).

Assim o leite materno muitas vezes é utilizado intercalado com a sacarose, que pode modificar seu potencial cariogênico. Nessa combinação, um biofilme diferenciado é esperado, com seleção ecológica de bactérias mais acidogênicas pela sacarose (MARSH, 2006), que poderiam também metabolizar de forma diferenciada o leite humano propiciando quedas significativas de pH. Nesse contexto, a hipótese a ser testada nesse estudo é que lactentes não-exclusivos com cárie de estabelecimento precoce possam ter biofilme ecologicamente diferenciado pelo consumo associado à sacarose, propiciando quedas de pH maiores que o leite humano.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Conceituação e prevalência

Em 1978, a *American Academy of Pediatric Dentistry* (AAPD) utilizou o termo “cárie de mamadeira” para intitular uma forma severa de cárie associada como aleitamento artificial e natural. Entretanto, nas duas últimas décadas, reconhecendo que este padrão da doença não estava consistentemente associado com práticas de alimentação inadequadas e que se tratava de uma doença infecciosa, adotou a terminologia “cárie de estabelecimento precoce” (CEP), proposta em 1998 pelo *National Institute of Dental and Craniofacial Research* (NIDCR), por melhor refletir a sua etiologia multifatorial (DRURY et al., 1999; AAPD, 2008).

O termo CEP é atualmente utilizado para descrever a presença em crianças de uma ou mais superfícies dentais cariadas (cavidades ou não), perdidas (devido à cárie) ou restauradas em qualquer dente decíduo até 71 meses de idade (DRURY et al., 1999). Em crianças abaixo de 3 anos de idade, qualquer sinal de lesão de cárie (manchas brancas ou cavidades) com padrão agudo, progressivo e rampante, é indicativo de severidade da doença, acrescentando-se o termo “severa” a esta terminologia (ISMAIL; SOHN, 1999; HALLET; O’ROURKE, 2002).

Outrora, diversas nomenclaturas foram utilizadas para descrever as lesões de cárie que acometiam crianças em idade pré-escolar, dentre elas “cárie da mamadeira do bebê”, “síndrome da mamadeira”, “cárie da amamentação” e “cárie rampante” eram termos usados para descrever o padrão da doença que se desenvolvia rapidamente, afetava muitos dentes, normalmente superfícies de baixo risco de desenvolvimento de cáries, como superfícies lisas de incisivos superiores, interferindo na aparência facial da criança (REISINE; DOUGLASS, 1998; DITTERICH et al., 2004).

Todavia, estes termos implicavam em causa, e recentes achados mostraram que embora o uso de líquidos adoçados durante a amamentação noturna seja um importante fator etiológico, ele isoladamente não é o único nem o principal fator (REISINE; DOUGLASS, 1998). Assim, outras terminologias equivocadamente utilizadas foram: “cáries labiais, cáries dos incisivos, cárie de bebê e cárie negligenciada” (BOWEN, 1998; ISMAIL; SOHN, 1999).

No que diz respeito à prevalência da doença, houve um declínio nos valores de cárie em dentes permanentes em diversos países do mundo nas últimas décadas, inclusive no Brasil (CURY et al., 2004). Por outro lado, na dentição decídua, esta parece ter se mantido constante em alguns países e aumentado em outros (RIBEIRO; RIBEIRO, 2004; CASAMASSIMO, 2006).

A comparação da prevalência de CEP nos diversos países se torna difícil em função das diferenças metodológicas empregadas nos estudos (ISMAIL; SOHN, 1999). No Brasil, o mais recente levantamento epidemiológico realizado pelo Ministério da Saúde encontrou uma prevalência de 26,85% de lesões de cárie de estabelecimento precoce em crianças de 18 a 36 meses e quase 60% das crianças de 5 anos apresentavam pelo menos um dente decíduo cariado sendo estes índices maiores em regiões menos desenvolvidas como Norte e Nordeste (BRASIL; Ministério da Saúde, 2004).

Estudos transversais realizados em três cidades brasileiras avaliaram a história atual (manchas brancas) e passada da doença e encontraram um valor de prevalência variando de 44 a 55% na faixa etária de 01 a 48 meses (BARROS et al., 2001; WAMBIER et al., 2004; RIBEIRO; OLIVEIRA; ROSEMBLATT, 2005). No Maranhão, a prevalência encontrada foi de 31,5% em crianças na faixa etária de 18 a 42 meses (NUNES, 2008).

Etiologia

A cárie é uma doença complexa e crônica resultante de um desequilíbrio de múltiplos fatores de risco e fatores protetores ao longo do tempo (CRALL, 2006). Desencadeia-se pela interação entre três fatores individuais primários: microorganismos cariogênicos, substrato cariogênico (carboidratos fermentáveis) e hospedeiro suscetível (dente) (AAPD, 2008). Dessa forma, a interação entre estes fatores, durante um período de tempo, promove o desenvolvimento das lesões de manchas brancas opacas, sem cavidade, sobre a superfície dental, resultantes da desmineralização do esmalte (LOSSO et al., 2009).

De acordo com a “Teoria da Placa Ecológica” a dinâmica do processo envolve essencialmente a interação de uma microbiota mista acidogênica e acidúrica sobre uma superfície dental suscetível, estimulada por uma dieta freqüentemente rica em carboidratos rapidamente fermentáveis que mantém o ambiente ácido (MARSH, 2006).

A ingestão de carboidratos fermentáveis provoca uma queda no pH do biofilme dentário, e a sua freqüente ingestão pode manter o pH por mais tempo abaixo do pH crítico para desmineralização do esmalte (pH=5,5), favorecendo a proliferação estreptococos do grupo mutans e lactobacilos, mas não exclusivamente eles, e conseqüentemente, um equilíbrio dinâmico para a desmineralização (MARSH, 2006; PAES LEME et al., 2006).

Diversos estudos têm demonstrado que a sacarose é o carboidrato mais cariogênico da dieta porque além de ser fermentado a ácidos diminuindo o pH, ele é metabolizado à polissacarídeos extracelulares (CURY et al., 2003; PAES LEME et al., 2006; TENUTA, 2006; VALE et al., 2007) e intracelulares (PAES LEME et al., 2006) por microorganismos do biofilme dental.

Os polissacarídeos extracelulares (principalmente glucanos insolúveis) desempenham importante papel na aderência seletiva e acúmulo de um amplo número de estreptococos cariogênicos sobre a superfície dental além de aumentar a porosidade da matriz, permitindo a difusão de mais substratos para o interior do biofilme e para a superfície do esmalte (PAES LEME et al., 2006; TENUTA, 2006). Como resultado desta difusão, as camadas mais profundas do biofilme mantêm um ambiente com pH mais ácido devido ao metabolismo dos carboidratos pelos microorganismos acidogênicos. Os polissacarídeos intracelulares funcionam como reservatório de substratos nos períodos de limitação de nutriente na cavidade oral, conseqüentemente, podem promover a formação de lesões de cárie pelo prolongamento da exposição de superfícies dentais a ácidos orgânicos e manutenção de um pH ácido na matriz da placa (PAES LEME et al., 2006).

Além da formação destes polissacarídeos, a sacarose também reduz as concentrações dos íons cálcio, fósforo inorgânico e fluoretos segundo modelos de pesquisa humana *in situ*. Estes íons são importantes no equilíbrio mineral e sua redução pode aumentar o potencial cariogênico do biofilme (CURY et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005; AIRES et al., 2006).

Algumas pesquisas postularam que a predominância de estreptococos do grupo mutans pode ser tão alta que a microbiota do biofilme cariogênico pode consistir quase completamente destes microorganismos (VAN HOUTE, 1994), mais especificamente *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (BECKER et al., 2002). Além destas bactérias, a presença de outros grupos bacterianos não-mutans capazes de tolerar ambientes ácidos foi confirmada recentemente através de métodos moleculares, demonstrando a atuação de outros microorganismos acidúricos no biofilme cariogênico (LI et al., 2007, ASS et al., 2008).

Mais recentemente, um estudo caso-controle realizado nos Estados Unidos com 22 crianças de 2 a 8 anos de idade, avaliou a associação entre CEP e a colonização por *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*. Os resultados demonstraram que todas as crianças com CEP foram *S. mutans* positivas e que 100% das crianças livre de cárie e 93% das crianças com CEP foram *S. sanguinis* positivas. A análise de regressão logística demonstrou que a interação entre *S. sanguinis* e *S. mutans* foi um significativo fator associado com o estado de cárie das crianças avaliadas, sugerindo que os níveis destes dois microorganismos desempenham um importante papel no desenvolvimento das lesões de cárie (GE et al., 2008).

Métodos moleculares também foram utilizados para detectar quais espécies bacterianas estavam associadas com cárie em dentes decíduos e para determinar um perfil bacteriano associado com diferentes estágios da doença. Os resultados destas pesquisas demonstraram que na dentição decídua as espécies *S. mutans* e *S. sanguinis* estavam

significativamente envolvidas com o início da doença (mancha branca), além de outras espécies como *Actinomyces gerenceseriae*, e espécies dos gêneros *Actinomyces sp.*(cl. GU067) e *Corynebacterium sp.* (cl. AK153) (ASS et al., 2008).

Fatores de risco da CEP

A literatura é vasta quando se discute os fatores de risco associados à cárie de estabelecimento precoce.

Resumidamente, destacam-se: a aquisição precoce de *Streptococcus mutans* (HARRIS et al., 2004; AL SHUKAIRY et al., 2006; LI et al., 2007; SEOW et al., 2009), a presença de biofilme visível (SANTOS; SOVIERO, 2002; SEOW et al., 2009), frequência no consumo de açúcares (FRAIZ; WALTER, 2001; LAW; SEOW, 2006; MARTENS et al., 2006; QIN et al., 2008), fraca higiene oral (LAW; SEOW, 2006; TIBERIA et al., 2007; SEOW et al., 2009) alimentação noturna com mamadeira (TIBERIA et al., 2007); informações e orientações sobre saúde bucal, incluindo o número de escovações (MORAES; POSSOBON; ORTIZ, 2000; MOURA et al., 2007), hipoplasia do esmalte (LAW; SEOW, 2006; SEOW et al., 2009) além dos fatores de risco sociais como baixo nível de instrução; condição sócio-econômica e etnicidade (CASAMASSIMO, 2006; ERSIN et al., 2006; SCHROTH; CHEBA, 2007; TIBERIA et al., 2007; QIN et al., 2008; SEOW et al., 2009).

Em revisão sistemática da literatura Harris et al., (2004) relacionou 106 fatores de risco para a CEP. Entretanto, os autores concluíram que existe uma carência de estudos longitudinais sobre a temática e que após avaliação de 77 artigos, a aquisição precoce de *Streptococcus mutans*, dieta altamente cariogênica, escovação dentária diária precária e hipoplasia do esmalte foram os fatores consistentemente associados ao desenvolvimento de CEP.

Na atual década, o uso contínuo de medicamentos pediátricos foi apontado como fator de risco para o desenvolvimento de CEP. Pesquisas brasileiras demonstraram que estes apresentavam alta concentração de açúcares (variando de 11.21 a 62.46%) e provocavam queda de pH a nível crítico para dissolução do esmalte (pH = 5.5), contribuindo para o desenvolvimento de CEP em crianças com doenças crônicas que necessitavam do uso destes fármacos (NEIVA et al., 2001; COSTA et al., 2004).

Associação aleitamento materno e CEP

O aleitamento materno noturno e à livre demanda, após um ano de idade, também tem sido apontado como fator de risco para o desenvolvimento de CEP, segundo estudos epidemiológicos publicados em periódicos importantes para a Odontologia (LI; WANG;

CAUFIELD, 2000; AZEVEDO; BEZERRA; TOLEDO, 2005; VAN PALENSTEIN; HELDERMAN; SOE; VAN'T HOF, 2006). Neste contexto, a AAPD não estimula o aleitamento materno administrado nestas circunstâncias desde a erupção do primeiro dente decíduo, por postular que este possa ser um fator de risco para o desenvolvimento destas lesões de cárie em crianças nos primeiros anos de vida (AAPD, 2008).

Um estudo transversal realizado no Brasil com crianças pré-escolares na faixa etária de 36 a 71 meses, avaliou a associação entre práticas de alimentação e CEP. Os resultados demonstraram a relação positiva entre CEP e amamentação noturna ($p=0.02$) ou amamentação além dos 12 meses de idade ($p=0.0004$), além do uso da mamadeira como substituto da chupeta ou o seu uso à livre demanda durante o dia ($p<0.0001$) (AZEVEDO; BEZERRA; TOLEDO, 2005).

Na Ásia, além do consumo de açúcares e arroz pré-mastigado, a amamentação noturna após 12 meses de idade também foi associada com CEP em um estudo coorte-retrospectivo realizado com 163 crianças na faixa etária de 25 a 30 meses (VAN PALENSTEIN HELDERMAN; SOE; VAN'T HOF, 2006).

Entretanto, esta associação não é consenso na literatura e revisões sistemáticas sugerem uma relação questionável dessas variáveis (SINTON et al., 1998; VALAITIS et al., 2000; HARRIS et al., 2004; RIBEIRO, RIBEIRO, 2004).

Neste sentido, após revisão sistemática de 151 artigos, Valaitis et al., (2000) encontraram associação moderada entre aleitamento materno e CEP em apenas três estudos. A qualidade das pesquisas foi considerada relativamente fraca, e as variáveis relacionadas foram de difícil comparação devido a definições pobres, inconsistentes, ambíguas ou ausentes. Os autores concluíram que não existem evidências fortes e consistentes de associação entre aleitamento materno e CEP, que não existe um período específico para o desmame, devendo-se encorajar as mulheres a continuar a amamentação por tanto tempo quanto elas desejarem.

Não obstante, em outra revisão, o aleitamento materno também não foi considerado fator de risco para o desenvolvimento de CEP. De 77 artigos, apenas seis se referiram ao aleitamento como fator de risco, porém não foram considerados de alta qualidade e poucos utilizaram medidas de validação para os hábitos dietéticos e de higiene oral (HARRIS et al., 2004).

Existem evidências de que o aumento da incidência de CEP seja resultado dos hábitos alimentares contemporâneos provenientes do processo de civilização do homem, e não devido ao aleitamento materno (RIBEIRO; RIBEIRO, 2004). Estas evidências foram confirmadas a partir de estudos de civilizações primitivas e pré-históricas onde a prática da amamentação prolongada era comum, a ingestão de carboidratos fermentáveis era pequena

e a prevalência de CEP encontrada a partir do estudo de crânios secos variou de 0.2% a 1.4% (TORNEY, 1992, PALMER, 1999).

Outra evidencia que confirma o efeito do processo de civilização sobre a alta prevalência de CEP foi a comparação da prevalência de dois estudos realizados em comunidades nativas americanas com hábito de aleitamento prolongado. O primeiro estudo encontrou uma prevalência de 1.4% de cárie após avaliação de 1.344 dentes decíduos humanos pré-históricos de nativos americanos de Dakota do Sul, Estados Unidos, e o outro, realizado na época moderna, encontrou uma prevalência de 53% em 16 comunidades de mesma cultura (BRUERD et al., 1989; PALMER, 1999).

A ação antibacteriana de alguns componentes do leite humano sobre a microbiota oral também podem sugerir a fraca associação entre o aleitamento materno e a CEP (GREGORY; FILLER, 1987; CAMLING et al., 1987; NIEMI et al., 2009).

A caseína é uma proteína do leite humano que apresenta comprovada atividade inibitória sobre aderência de *S. mutans* e *S. sobrinus* aos cristais de hidroxiapatita segundo estudos *in vitro* (NIEMI et al., 2009). Quando hidrolisada a caseinofosfopeptídeos (CPP), além de reduzir a aderência e colonização destas cepas de mutans, auxilia no processo de remineralização de lesões de cárie já instaladas (SCHÜPBACH et al., 1996; KRUGER; CÂNDIDO, 2009).

A lactoperoxidase salivar na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) do biofilme dental, cataliza a oxidação do íon tiocianato (SCN^-) a hipotiocianato ($OSCN^-$), o qual é altamente tóxico à célula bacteriana, uma vez que atua na via glicolítica, principalmente de espécies *Streptococcus* (THOMAS et al., 1994; KOU; TAKAHAMA, 1995). O papel da lactoperoxidase do leite sobre microorganismos relacionados à cárie ainda não está clara, entretanto as pesquisas ressaltam que esta proteína no leite humano encontra-se na forma ativa (LÖNNERDAL, 2003), contém maior quantidade de prolina e carboidratos e menor quantidade de componentes aromáticos além de ser cinco vezes mais potente quando comparada com a sua homóloga salivar (PRUITT, 1987).

A lactoferrina é uma glicoproteína salivar presente também no leite materno que possui atividade bacteriostática na medida em que inibe a proliferação bacteriana pela sua afinidade com o ferro, ligando-se a ele e retirando-o do meio. Este íon é importante para ao crescimento da maioria das espécies bacterianas e a sua ausência permite que estas não se multipliquem e assim sejam removidas da boca pela deglutição ou outros mecanismos de defesa (JALIL et al., 1992), desta forma atuando sobre o processo de formação do biofilme (VALENTI et al., 2004). Uma ação bactericida também foi relatada com relação a esta proteína em sua forma livre, atividade esta que parece estar relacionada à formação de radicais, visto que a mesma é inibida na presença de enzimas receptoras de oxigênio, bem como sob condições estritamente anaeróbicas (ARNOLD et al., 1980).

A imunoglobulina A secretora atua sobre a aderência e agregação bacteriana diminuindo a atividade da glucosiltransferase, das adesinas Spap (antígeno I/II) e a síntese de GbpB (Proteína ligante de glucano – B). Estes são fatores de virulência relacionados ao metabolismo da sacarose por *S. mutans* (GREGORY; FILLER, 1987; NOGUEIRA et al., 2005).

Os resultados de um estudo *in vitro* sobre a interferência de componentes do leite humano na adesão de cepas de *S. mutans* e *S. sobrinus* a cristais de hidroxiapatita, mostraram que a caseína e a imunoglobulina A secretora do leite humano foram capazes de interferir na aderência de todas as cepas testadas, enquanto a lactoferrina inibiu apenas duas cepas de *S. mutans* (Ingbritt e NG8), sugerindo o efeito tópico do leite humano sobre bactérias cariogênicas (NIEMI et al., 2009).

Com relação ao pH do biofilme oral frente a um desafio com lactose humana, as pesquisas *in vitro* e *in situ* também têm demonstrado a fraca associação deste carboidrato com a CEP (BIRKHED, IMFELD, EDWARDSSON, 1993; ARAÚJO et al., 1997; ERICKSON; MAZHARI, 1999).

Ao levantar a hipótese de que o lactose poderia ser metabolizada mais rapidamente após um período de adaptação do biofilme, estudiosos da Suécia observaram que este carboidrato causou queda de pH após um período de 6 semanas de adaptação, porém com valores inferiores a glicose (BIRKHED, IMFELD, EDWARDSSON, 1993). Outro estudo *in vitro* demonstrou que a queda de pH do leite humano não é significativa quando comparada a um controle negativo de água, que o leite isoladamente não causou desmineralização do esmalte após 12 semanas de exposição, entretanto, após suplementação com solução de sacarose 10%, o leite humano causou lesão de cárie em dentina em aproximadamente 3 semanas (ERICKSON; MAZHARI, 1999).

Resultados de um estudo *in situ* e *in vitro* sobre a influência do uso de soluções de sacarose 20%, lactose 20% e frutose 10% + glicose 10% no potencial cariogênico dos *S. mutans*, demonstraram que todas estas soluções causaram queda de pH em um biofilme formado em 48 horas, porém, a acidez no meio de cultura empregado foi obtida de forma mais rápida e mais prolongada na presença da solução de sacarose (BORGES et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial acidogênico do leite materno em crianças com e sem experiência da doença cárie.

3.2 Objetivos Específicos

- Comparar a queda de pH no biofilme oral de lactentes não-exclusivos cárie ativos e livres de cárie após amamentação com leite humano ou exposição à sacarose.
- Comparar a microbiota oral de lactentes não-exclusivos com e sem CEP.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Ciente das normas que regulamentam os aspectos éticos de pesquisas envolvendo seres humanos (resolução 196/96 do CNS/MS), este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) – Protocolo nº 337/06 (ANEXO).

Os pais ou responsáveis legais das crianças envolvidas foram informados do caráter do estudo e assinaram um “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” para permitir a participação de seus filhos na pesquisa. (APÊNDICE 1).

Por razões éticas, todas as crianças avaliadas no estudo que precisaram de tratamento cirúrgico-restaurador foram encaminhadas para atendimento na Clínica de Odontopediatria da UFMA.

4.2 Caracterização do estudo e amostragem

O estudo foi do tipo ensaio clínico *in vivo*, no qual foi avaliado o potencial acidogênico do biofilme dental em lactentes não- exclusivos na faixa etária acima de 24 meses com e sem cárie precoce. Foram selecionadas crianças pré-escolares de 07 creches comunitárias em bairros periféricos no município de São Luís – MA.

Os critérios de exclusão dos grupos de estudo foram: doenças sistêmicas debilitantes que poderiam ter influência sobre a doença cárie; alterações salivares (xerostomia); crianças prematuras ou com baixo peso ao nascer ou ainda desnutridas, pois essas alterações poderiam predispor a deficiência na formação do esmalte influenciando a manifestação da doença. O uso de antibióticos nos últimos 30 dias também foi considerado fator de exclusão, pois poderiam interferir na microbiota do biofilme oral fornecendo resultados de pH não confiáveis.

O cálculo amostral foi realizado a partir de um estudo piloto com 8 lactentes não-exclusivos, sendo 4 com cárie precoce e 4 sem a doença. Foram comparados as médias e os desvios padrões da área sobre a curva de pH6.5 (AUC6.5) nas crianças livres de cárie e nas crianças com cárie precoce. Esta variável foi calculada através de um software específico para pH (LARSEN; PEARCE, 1997). O teste t para amostras não-pareadas (Programa Biostat 3.0 – Instituto Mamirauá, Belém, PA, Brasil) foi utilizado adotando-se um nível de significância de 5% e poder do teste de 80%, totalizando uma amostra de 5 crianças. Por margem de segurança e considerando-se a possibilidade de 20% de perdas, o valor foi ajustado para 10 crianças em cada grupo.

Para seleção dos voluntários foi realizado um exame clínico para verificação da presença ou ausência de cárie precoce, seguindo-se rigorosamente as normas estabelecidas de biossegurança. Para este exame foi utilizado o índice ceo-d (cariados, perdidos e obturados) indicados pela OMS (1987), além de mancha branca ativa (lesões ativas não cavitadas), representando a atividade inicial da doença (NYVAD; MACHIULSKIENE; BAELUM, 2003).

A amostra foi obtida após visita a 07 creches comunitárias em bairros periféricos no município de São Luís – MA, Brasil, sendo convidados a participar do estudo todos os lactentes não-exclusivos com idade superior a 24 meses, até se chegar ao n adequado. Do total de 20 crianças selecionadas, 4 crianças não compareceram ao experimento no dia marcado e a amostra final constou de 9 crianças livre de cáries e 7 crianças com CEP.

4.3 Critérios de avaliação

4.3.1 Avaliação da dieta e hábitos de higiene oral

Durante entrevista com os pais, dados da dieta e higiene oral das crianças foram obtidos através de um questionário estruturado e validado em estudo piloto ($k=0.79$) para esse critério (NUNES, 2008).

Como a dieta é um fator determinante da doença cárie e crianças amamentadas com mais de um ano de idade fazem uso de outros alimentos que não o leite materno, esse dado se fez importante, pois assim a ingestão de alimentos associados ao leite poderia ser um fator de confusão ao se avaliar as variáveis nesse estudo.

4.3.2 Acidogenicidade do Biofilme Oral

Nas duas etapas do experimento foi solicitado aos pais ou responsáveis legais pelas crianças que cessassem qualquer medida de higiene oral por 72 horas antes da aferição de pH para formação de um biofilme oral espesso (LINGSTRÖM et al., 2000], e também todas deveriam estar em jejum desde a noite anterior ou no mínimo 2 horas antes da primeira medição para prevenir influências indevidas nas medições.

A acidogenicidade do biofilme oral nas duas fases do experimento foi realizada utilizando um microeletrodo de toque de pH (Beetrode NMPH3 08J, WPI, New Haven, Conn., EUA) conectado a um medidor de pH (Orion 4 Star Thermo Scientific) combinado com um eletrodo de referência de vidro (Orion Res Inc., Cambridge, Mass., EUA).

O microeletrodo foi diariamente calibrado com tampões de pH 4.0 e 7.0 por três vezes antes do início das aferições, e uma segunda calibração foi realizada após a segunda

aferição ($\text{pH}_{5\text{min}}$) em todos os pacientes. Após a calibração do aparelho, a aferição do pH do biofilme foi realizada com a inserção da ponta do microeletrodo diretamente no biofilme oral. Uma ponte de referencia salina foi obtida através dos responsáveis pelas crianças: com uma mão, mantinham contato com o corpo da criança, e com a outra mão, inseriam o dedo indicador em uma placa de Petri contendo solução de cloreto de potássio 3 Molar (KCl 3M) e o eletrodo de referência de vidro.

Em uma fase do experimento, foi medido o pH descanso ($\text{pH}_{\text{descanso}}$) do biofilme dental em um dente teste escolhido entre os que apresentassem maior quantidade de placa visível. Após essa medição inicial, a criança foi amamentada e foi aferido, no mesmo local, o pH após 5 ($\text{pH}_{5\text{min}}$) e 30 (pH_{final}) minutos do término da amamentação.

De forma cruzada, uma outra etapa do experimento avaliou a queda de pH no biofilme oral submetido a um gotejamento de solução de sacarose 10%, sendo realizada após 2 semanas da primeira etapa. Foi aferido o pH descanso do biofilme, em seguida, foram gotejadas 3 (três) gotas da solução de sacarose no dente teste. Posteriormente, foram avaliados o pH após 5 e 30 minutos do gotejamento.

A escolha da solução de sacarose nesta concentração foi baseada no estudo de Aires et al., (2006) que avaliaram o efeito da concentração de sacarose sobre a desmineralização do esmalte e sobre o biofilme formado *in situ*, e constataram que a concentração ideal para a formação de um biofilme cariogênico estava acima de 5%.

Com os dados de pH registrados, foram tabulados os valores de $\text{pH}_{\text{descanso}}$, pH após 5 minutos ($\text{pH}_{5\text{min}}$), pH após 30 minutos (pH_{final}), variação de pH em 5 minutos ($\Delta\text{pH}_{5\text{min}}$) e área sobre a curva de pH6.5 ($\text{AUC}_{6.5}$) nas duas fases do experimento para posterior análise estatística.

Todos os dados referentes ao item 4.3 foram anotados em uma ficha específica para essa finalidade (APÊNDICE 2).

4.3.3 Procedimentos Microbiológicos

a) Coleta de Biofilme Oral e Saliva

Após aferição do pH, foi coletado “pool” de biofilme oral das superfícies dos dentes presentes de cada criança com auxílio de cureta periodontal, sendo em seguida, depositado em frascos pré-pesados tipo *Eppendorf*, contendo pérolas de vidro. Os frascos foram novamente pesados, devidamente codificados e acondicionados em bolsa de gelo e posteriormente processados para contagem de estreptococos do grupo mutans (EGM).

A saliva também foi coletada com auxílio de “swab” estéril retirado de um tubo tipo *Eppendorf* autoclavado pré-pesado com auxílio de uma pinça hemostática. Em seguida este

foi colocado por 5 segundos na região sublingual para saturação e depois mais 5 segundos no dorso da língua fazendo movimentos giratórios para coletar microorganismos desta região. Após a coleta, cada “swab” foi novamente colocado no tubo, devidamente pesado, codificado e acondicionado em bolsa de gelo, e posteriormente processado também para contagem de EGM.

Todas as amostras de saliva e placa foram imediatamente transportadas ao Laboratório de Microbiologia, nunca excedendo o período de 2 horas após a coleta.

b) Processamento Microbiológico do Material

No laboratório de Microbiologia, foi adicionado 1mL de solução salina 0,9% nos tubos *Eppendorfs* com as amostras de biofilme e saliva. Posteriormente, os tubos foram submetidos à agitação em vortex (Phoenix – AT 56) durante 60 segundos para dispersão dos agregados bacterianos e, em seguida, foram preparadas diluições decimais também em solução salina.

Gotas de 20µL de cada diluição foram inoculadas, em duplicata, em agar mitis salivarius (MSA) com adição de 20% de sacarose, 0,2 unidades/mL de bacitracina e 1% de telurito de potássio (MSB) para contagem de *Streptococcus mutans* (GOLD et al., 1973); agar Rogosa para contagem de *Lactobacillus spp.* (ROGOSA et al., 1951) e agar sangue para contagem de microrganismos totais.

As placas de agar Rogosa e agar sangue foram incubadas em anaerobiose por 48 horas (JURGENSEN; JURGENSEN, 1982), enquanto que as placas de MSB foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ pelo mesmo período de tempo (GOLD et al., 1973).

Após o período de incubação, a estimativa do número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada com o auxílio de uma lupa estereoscópica. Esta contagem foi realizada em duplicata e os valores para as amostras de biofilme foram expressas em UFC por miligrama (UFC/mg) e para as amostras de saliva em UFC por mililitro (UFC/mL). A reprodutibilidade do método de contagem foi verificada pela comparação das placas A e B da contagem total de microrganismos de toda a amostra. Não foi observada diferença ($p=0,50$) e houve correlação positiva entre as contagens ($r=0,92$; $p<0,001$).

Cerca de 3 colônias de cada amostra, com características morfológicas de EGM, crescidas em meio MSB, foram colhidas e incubadas em 1,6 ml de meio BHI (*Brain Heart Infusion*) a 37°C por 24 horas em atmosfera de CO₂ a 10%, para verificação da morfologia celular pela coloração de Gram e identificação dos isolados bacterianos através da reação em cadeia da polimerase (PCR) segundo metodologia de Flório (2003).

c) Identificação de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* por PCR

Para obtenção do DNA bacteriano, 1ml dos isolados incubados em meio BHI foi colhido e colocado em tubos *Eppendorfs* esterilizados. As células foram centrifugadas (14.000 r.p.m./2 min), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 800 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0). Após agitação e nova centrifugação nas mesmas condições, as células foram ressuspendidas e lavadas por mais duas vezes, para então serem submetidas a um banho de fervura por 10 minutos em 50µL de tampão TE (modificado de WELSH; MCCLELLAND, 1990; SAARELA et al., 1996). Após centrifugação (14.000 r.p.m./10 seg) e transporte do sobrenadante para outro tubo tipo *ependorf* obteve-se as amostras de DNA.

As amostras de DNA foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para confirmação molecular da identidade de *S. mutans* e, posteriormente, de *S. sobrinus* na presença de pares *primers* específicos para a porção do gene correspondente a glicosiltransferase (*gtfB* de *S. mutans*, *gtfI* de *S. sobrinus*).

A reação de PCR foi processada em 25µL de uma mistura de reagentes contendo 1x solução tampão (10x Reaction Buffer Taq Polymerase), 1,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de dNTP (DNA Polymerization Mix), 0,2 µM de cada *primer* 1,5 U de Taq DNA Polymerase e uma alíquota de 2,5 µL de cada amostra de DNA. Além das amostras, em cada reação de PCR, foram utilizados como controles positivos, DNA extraído de *S. mutans* (ATCC 00446) e de *S. sobrinus* (ATCC 27607) e como negativo, água destilada deionizada esterilizada.

Esta mistura reagente foi submetida a um aparelho termociclador convencional (GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer, Applied Biosystem, Singapura) com o *primer* para *S. mutans* de acordo com as seguintes condições térmicas: 30 ciclos de desnaturação do DNA a 95°C por 30 segundos, seguida da fase de hibridização dos *primers* a 59° C por 30 segundos e fase de extensão a 72°C por 1 minuto (OHO et al., 2000).

Para a confirmação molecular da identidade de *S. sobrinus*, realizada quando da ausência de banda que caracterizasse *S. mutans* na reação anterior, outra alíquota da amostra de DNA foi submetida a uma nova reação de PCR, conforme programação supracitada, utilizando-se o *primer* específico para detecção de *S. sobrinus* (OHO et al., 2000).

Os produtos da PCR foram analisados imediatamente, ou armazenados em freezer a -20°C. A análise dos produtos da PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão Tris-Borato-EDTA (pH 8,0). Em cada gel foi incluído um padrão de peso molecular de 100 pb. Após o término da corrida (60 volts por 1 hora), o gel foi corado com brometo de etídio a 0,5 µg/mL (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e as bandas observadas com auxílio de um transluminador de luz ultravioleta (Pharmacia LKB – MacroVue; Pharmacia Biotech - Image Master –VDS).

4.3.4 Análise estatística

Para análise estatística, a unidade experimental foi o voluntário. Inicialmente todas as variáveis avaliadas (UFC/mg, UFC/ml, $\text{pH}_{\text{descanso}}$, $\text{pH}_{5\text{min}}$, pH final, $\Delta\text{pH}_{5\text{min}}$ e $\text{AUC}_{6.5}$) foram submetidas ao teste de Shapiro Wilk para verificação da normalidade dos dados. As variáveis $\text{pH}_{\text{descanso}}$, $\text{pH}_{5\text{min}}$, pH final não violaram este pressuposto e foram submetidos aos testes t de Student pareado, para comparação dos tratamentos empregados e não pareado, para comparação entre os grupos livre ou com CEP. As variáveis não normais (UFC/mg, UFC/ml, $\Delta\text{pH}_{5\text{min}}$ e $\text{AUC}_{6.5}$) foram transformadas em Log10 pelo método de Box e Cox e os dados que continuaram violando a distribuição normal foram submetidos a testes não paramétricos, sendo o de Wilcoxon para os dados pareados e o de Mann-Whitney para os dados não-pareados.

Para realização destas análises foi utilizado o software Biostat versão 3.0 (Instituto Mamirauá, Belém, PA, Brasil) adotando-se um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Com relação à análise microbiológica, os resultados mostraram uma maior frequência de *Streptococcus mutans* no biofilme e saliva de pacientes CEP, com diferença significativa quando comparada ao grupo livre de cáries ($p < 0.05$). Todos os pacientes CEP (100%) e apenas 2 pacientes livre de cáries (22%) apresentaram amostras de biofilme e saliva colonizadas por este microorganismo (Tabela 1).

Na comparação entre os grupos de crianças com e sem cárie, o tratamento com leite não apresentou diferença estatística para nenhuma das variáveis de pH observadas ($p > 0.05$). Porém, a solução de sacarose provocou um maior $\Delta\text{pH}_{5\text{min}}$ no biofilme dos pacientes CEP ($p = 0.0317$) (Tabela 2).

Na comparação entre os tratamentos dentro de um mesmo grupo, a sacarose provocou maior queda de pH no biofilme de pacientes livre de cáries que o leite humano ($p = 0.0423$). Os resultados também mostraram que para os indivíduos CEP, a sacarose apresentou um potencial acidogênico maior que o leite ao se comparar as variáveis $\text{pH}_{5\text{min}}$ ($p = 0.0308$), $\Delta\text{pH}_{5\text{min}}$ ($p = 0.018$) e $\text{AUC}_{6.5}$ ($p = 0.0104$) (Tabela 2; Figura 1).

REFERÊNCIAS

AAS, J. A.; GRIFFEN, A. L.; DARDIS, A. R.; LEE, A. M.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E.; LEYS, E. J.; PASTER, B. J. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. **J Clin Microbiol**, v.46, n.4, p. 1407-1417, 2008.

AL SHUKAIRY H.; ALAMOUDI, N.; FARSI, N.; AL MUSHAYT, A.; MASOUD, I. A comparative study of *Streptococcus mutans* and *lactobacilli* in mothers and children with severe early childhood caries (SECC) versus a caries free group of children and their corresponding mothers. **J Clin Pediatr Dent**, v.31, n.2, p. 80-5, 2006.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY: Reference manual 2003- 2004. **Pediatr Dent**, v.30, p. 40-43, 2008.

AIRES, C. P.; TABCHOURY, C. P. M.; DEL BEL CURY, A. A.; CURY, J. A. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed *in situ* and on enamel demineralization. **Caries Res**, v. 40; p. 28-32, 2006.

ARAUJO F.B.; CURY J.A.; ARAUJO D. R.; VELASCO L. F. L. Estudo *in situ* da cariogenicidade do leite humano: aspectos clínicos. **Rev ABO Nac**, v.4, p.42-44, 1997.

ARNOLD, R. R.; BREWER, M.; GAUTHIER, J. J. Bacterial activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganism. **Infect Immun**, v.28, p.893-989. 1980.

AZEVEDO T.D.; BEZERRA A. C.; TOLEDO O. A. Feeding habits and severe early caries in Brazilian preschool children. **Pediatr Dent**, v. 27, p. 28-33, 2005.

BANKEL M. et al. Caries and associated factors in a group of Swedish children 2- 3 years of age. **Swed Dent J**, v.30, n.4, p.137-46, 2006.

BARROS, S. G.; CASTRO ALVES, A.; PUGLIESE, L. S.; REIS, S. R. A. Contribuição ao estudo da cárie dentária em crianças de 0-30 meses. **Pesqui Odontol Bras**, v.15, n.3, p. 215-222, set/out, 2001.

BECKER, M. R.; PASTER, B. J.; LEYS, E. J.; MOESCHBERGER, M. L.; KENYON, S. G.; GALVIN, J. L.; BOCHES, S. K.; DEWHIRST, F. E.; GRIFFEN, A. L. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. **J Clin Microbiol**, v.40, p.1001-1009, 2002.

BIRKHED D.; IMFELD T.; EDWARDSSON S. pH changes in human dental plaque from lactose and milk before and after adaptation. **Caries Res**, v. 27, p. 43-50, 1993.

BORGES M. F.; CASTILHO A. R. F.; PEREIRA C. V. Influência da sacarose, lactose e glicose + frutose no potencial cariogênico de *S. mutans*: estudo *in situ* e *in vitro*. **Rev odontol ciênc**, v.23, p.360-364, 2008.

BOWEN, W. H. Response to Seow: biological mechanisms of early childhood caries. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 26, suplemento 1, p. 28-31, 1998.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Política de Saúde. Organização Pan Americana da Saúde. *Guia alimentar para crianças menores de dois anos*. Brasília: **Ministério da Saúde**; 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Políticas de Saúde. Projeto SB Brasil 2003: Condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais. Brasília: **Ministério da Saúde**.68p. Série C. Projetos , Programas e relatórios, 2004.

BRUERD, B.; KINNEY, M. B.; BOTHWELL, E. BBTD in American Indian and Alaska Native communities: a model for planning. **Public Health Rep**, v.104, p.63-40, 1989.

CAMLING, E.; GAHNERD, L.; KRASSE, B. The Relationship between IgA antibodies to *Streptococcus mutans* antigens in human saliva e breast milk and the numbers of indigenous oral *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol**, v.32, n.1, p.21-25, 1987.

CASAMASSIMO, P. S. If early childhood caries is an infectious disease.....which one? **J Dent Child**, v.73, n.1, 2006.

CHIBINSKI, A. C. R.; WAMBIER, D. S. Protocolo de promoção de Saúde Bucal para a criança portadora de cárie de estabelecimento precoce. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, v.5, n.3, p.281-290, set/dez, 2005.

COSTA, C. C.; ALMEIDA, I.C.; RAYMUNDO, M. S.; FETT, R. Análise do pH endógeno, da acidez e da concentração de sacarose de medicamentos pediátricos. **Rev Odonto Cienc**, v.19, p.164-169, 2004.

CRAL, J. J. Rethinking prevention. **Pediatr Dent**, v.28, n.2, p.96-101, 2006.

CURY, J. A.; MARQUES, A. S.; TABCHOURY, C. P. M.; DEL BEL CURY, A. A. Composition of dental plaque formed in the presence of sucrose and after its interruption. **Braz Dent J**, v.14, n.3, p.147-152, 2003.

CURY, J. A.; TENUTA, L. M. A.; RIBEIRO, C. C. C.; PAES LEME, A. F. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence. **Braz Dent J**, v.15, n.3, p.167-174, 2004.

DITTERICH, R. G.; ROMANELLI, M. V.; RASTELLI, M. C.; WAMBIER, D. S. Cárie de acometimento precoce: uma revisão. **Publ UEPG Biol Saúde**, v.10, n.3/4, p.33-41, 2004.

DRURY T. F.; HOROWITZ A. M.; ISMAIL A. I.; MAERTENS M. P.; ROZIER R. G.; SELWITZ R. H. Diagnosis and reporting early childhood caries for research purposes. A report of a workshop sponsored by the National Institute of Dent and Craniofacial Research, the Health Resources and Services Administration, and the Health Care Financing Administration. **J Public Health Dent**, v.59, p.192-197, 1999.

DONG, Y. M.; PEARCE, E. I. F.; YUE, L.; LARSEN, M. J.; GAO, X. J.; WANG, J. D. Plaque pH and associated parameters in relation to caries. **Caries Res**. v. 33, p. 428-436, 1998.

ERICKSON, P. E.; MAZHARI, E. Investigation of the role of human milk in caries development. **Pediatr Dent**, v.21, p.86-90, 1999.

ERSIN, N. K.; ERONAT, N.; COGULU, D.; UZEL, A., AKSIT, S. Association of maternal-child characteristics as a factor in early childhood caries and salivary bacterial counts. **J Dent Child**. v.73, n.2, p.105-111, May-Aug, 2006.

FLÓRIO, F. M. **Padrão de colonização por estreptococos Grupo mutans em crianças submetidas ou não a Programa em promoção de saúde bucal**. 2003. 664f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

FRAIZ, F. C.; WALTER, L. R. F. Estudo de fatores associados à cárie dental em crianças que receberam atendimento odontológico precoce. **Pesq Odontol Bras.** v.15, n.3, p.201-207, 2001.

GE, Y.; CAUFIELD, P. W.; FISCH, G. S.; LI, Y. *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis* colonization correlated with caries experience in children. **Caries Res**, v.42, p.444-448, 2008.

GOLD, O.G.; JORDAN, H. V., VAN HOUTE J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol**, v.18, p.1357-1364, 1973.

GREGORY, R. L.; FILLER, S. J. Protective secretory immunoglobulin A antibodies in humans following oral immunization with *Streptococcus mutans*. **Infect Immune**, v.55, n.10, p.2409-2415, 1987.

HALLETT, K. B.; O'ROURKE, P. K. Early childhood caries and infant feeding practice. **Community Dent Health**, v.19, n.4, p.237-242, dez, 2002.

HARRIS, R.; NICOLL, A. D.; ADAIR, P. M.; PINE, C. M. Risk factors for dental caries in young children: a systematic review of the literature. **Community Dent Health**, v.21 (Supl), p.71-85, 2004.

ISMAIL, A. I.; SOHN, W. A systematic review of clinical diagnostic criteria of early childhood caries. **J Public Health Dent**, v.59, n.3, p.171-191, 1999.

JALIL, R.A.; ASHLEY, F.P.; WILSON, R.F. The relationship between 48-h dental plaque accumulation in young human adults and concentrations of hypothiocyanite, free and total lysozyme, lectoferrin and secretory immunoglobulin A in saliva. **Arch Oral Biol**, v.37, p.23-28, 1992.

JURGENSEN, C. A.; JURGENSEN, L. D. Copper oxidation, an alternative method for obtaining anaerobiosis (in portuguese). **Rev Bras Patol Clin**, v.8, p.58-63, 1982.

KING, N. M.; WU II; TSAI J. S. Caries prevalence and distribution, and oral health habits of zero-to four-year- old children in Macau, China. **J Dent Child**, v.70, n.3, p.243-249, set/dez, 2003.

KOU, F.; TAKAHAMA, U. Hydrogen peroxide-induced luminescence and evolution of molecular oxygen by human saliva. **Arch Oral Biol**, v.40, p.15-21, 1995.

KRUGER, C. C. H.; CÂNDIDO, L. M. B. Caseinofosfopeptídeos: obtenção e atividade biológica. **Alim Nutr**, v.20, n.1, p.167-173, jan/mar, 2009.

LARSEN M. J.; PEARCE E. I. A computer program for correlating dental plaque pH values, cH+, plaque titration, critical pH, resting pH and the solubility of enamel apatite **Arch Oral Biol**, v.42, p.475-480, 1997.

LAW, V. SEOW, W. K. A longitudinal controlled study of factors associated with mutans streptococci infection and caries lesion initiation in children 21 to 72 months old. **Pediatr Dent**, v. 28, p. 59-65, 2006.

LI, Y., GE, Y.; SAXENA, D.; CAUFIELD, P. W. Genetic profiling of the oral microbiota associated with severe early-childhood caries. **J Clin Microbiol**, v.45, n.1, p.81-87, 2007.

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, p. 123-132, 2000.

LÖNNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **Am J Clin Nutr**, v.77(Supl), p.1537S-1543S, 2003.

LOSSO, E. M.; TAVARES, M. C.; DA SILVA, J. Y.; URBAN, C. A. Severe early childhood caries: an integral approach. **J Pediatr**, v.85, n.4, p.295-300, 2009.

MARSH P. D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. **Oral Health**, v.6, p. 1-7, 2006.

MARTENS, L.; VANOBBERGEN, J.; WILLEMS, S.; APS, J.; DE MAESENEER, J. Determinants of early childhood caries in a group of inner-city children. **Quintessenc Int**, v.37, n.7, p.527-536. jul/ago, 2006.

MORAES, A. B. A.; POSSOBON, R. F.; ORTIZ, C. E. Motivação e comportamento preventivo de saúde bucal em programa de assistência odontopediátrica na primeira infância. **Pesqui Odontol Bras**, v.14, n.3, p.287-293, jul/set, 2000.

MOURA, L. F. A. D.; MOURA, M. S.; TOLEDO, O. A. Conhecimentos e práticas em saúde bucal de mães que freqüentaram um programa odontológico de atenção materno- infantil. **Ciência e Saúde Coletiva**. v.12, n.4, p.1079-1086, 2007.

NEIVA, A.; SILVA, V. S.; MAIA, L. C.; SOARES, E. L.; TRUGO, L. C. Análise in vitro da concentração de sacarose e pH de antibacterianos de uso pediátrico. **Pesq Bras Odontopediatr Clin Integr**, v.1, p.9-16, 2001.

NIEMI, L. D.; HERNELL, O.; JOHANSSON, I. Human milk compounds inhibiting adhesion of mutans streptococci to host ligand-coated hydroxyapatite in vitro. **Caries Res**, v.43, p.171-178, 2009.

NIQUINI, R. P.; BITTENCOURT, S. A.; LACERDA, E. M. A.; LEAL, M. C. Fatores associados à introdução precoce de leite artificial, município do Rio de Janeiro, 2007. **Rev Bras Epidemiol**, v.12, n.3, p.446-457, 2009.

NOGUEIRA, R. D.; ALVES, A. C.; NAPIMOGA, M. H.; SMITH, D. J.; MATTOS-GRANER, R. O. Characterization of salivary immunoglobulin a responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. **Infect Immun**, v.73, p.5675-5684, 2005.

NUNES, A. M. M. **Associação entre aleitamento materno e cárie de estabelecimento precoce em crianças de 18 a 42 meses**. 2008. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2008.

NYVAD, B.; MACHIULSKIENE, V.; BAELUM, V. Construct and predictive validity of clinical caries diagnostic criteria assessing lesion activity. **J Dent Res**. v.82(Supl 2), p.117-122, 2003.

OHO, T.; YAMASHITA, Y.; SHIMAZAKI, Y.; KUSHIYAMA, M.; KOGA, T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by Polymerase Chain Reaction. **Oral Microbiol Immunol**, p.15, p.258-262, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), FUNDAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A INFÂNCIA- UNICEF. **Estrategia Mundial para la Alimentación del Lactante y del Niño Pequeño**. Genebra, 30 p., 2003.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia alimentar para crianças menores de dois anos / Secretaria de Políticas de Saúde, Brasília: **Ministério da Saúde**, 152p (Série A. Normas e Manuais Técnicos; n. 107) 2002.

PAES LEME, A. F.; KOO, H.; BELLATO, C. M.; BEDI, G.; CURY, J. A. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation – new insight. **J Dent Res**, v.85, n.10, p.878-887, 2006.

PALMER, B. Their position on the relationship between breastfeeding and infant caries. **Pediatr Dent**, v.21, p.86-90, 1999.

PRUITT, K.M. The salivary peroxidase system: thermodynamic, kinetic and antibacterial properties. **J Oral Pathol**, v.16, p.417-20, 1987.

QIN, M.; LI, J.; ZHANG, S.; MA, W. Risk factors of severe early childhood caries in children younger than 4 years old in Bijibg, China. **Pediatr Dent**, v.30, p.122-128, 2008.

REISINE, S.; DOUGLASS, J.M. Psychosocial and behavioral issues in early childhood caries. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.26, n.1, p.32-44, 1998.

RIBEIRO, A. G.; OLIVEIRA, A. F.; ROSEMBLATT, A. Cárie precoce na infância: prevalência e fatores de risco em pré-escolares, aos 48 meses, na cidade de João Pessoa, Paraíba, Brasil. **Cad Saúde Pública**. v.21, n.6, p.1695-1799, nov/dez, 2005.

RIBEIRO N. M. E.; RIBEIRO M. A. S. Aleitamento materno e cárie do lactente e do pré-escolar: uma revisão crítica. **J Pediatr**, v.80, p.199-210, 2004.

RIBEIRO, C. C. C.; TABCHOURY, C. P. M.; DEL BEL CURY, A. A.; TENUTA, L. M.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. **Br J Nutr**, v.94, p.44-50, 2005.

ROGOSA, M.; MITCHELL, J.A.; WISEMAN, R. F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. **J Dent Res**, v. 30, n. 5, p. 682-689, 1951.

RØLLA, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. **Scan J Dent Res**, v. 97, p. 115-119, 1989.

ROSENBLATT, A.; ZARZAR, P. Breast-feeding and early childhood caries: an assessment among Brazilian infants. **J Pediatr Dent**, v.14, n.6, p.439-445, nov, 2004.

SAARELA, M.; HANNULA, J.; MATTO, J.; ASIKAINEN, S.; ALALUUSUA S. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Arch Oral Biol**, v.41, p.821-826, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor Press. Nova York, 1989.

SANTOS, A. P.; SOVIERO, V. M. Caries prevalence and risk factors among children aged 0 to 36 months. **Pesqui Odontol Bras**. V.16, n.3, p.203-208, 2002.

SCHROTH, R. J.; CHEBA, V. Determining the prevalence and risk factors for early childhood caries in a community dental health clinic. **Pediatr Dent**, v.29, p.387-396, 2007.

SCHÜPBACH, P.; NEESER, J.R.; GOLLIARD, M.; ROUVET, M.; GUGGENHEIM, B. Incorporation of caseinoglycomacropeptide and caseinophosphopeptide into the salivary pellicle inhibits adherence of mutans streptococci. **J Dent Res**, v.75, p.1779-1788, 1996.

SEOW, W. K.; CLIFFORD, H.; BATTISTUTTA, D.; MORAWSKA, A.; HOLCOMBE, T. Case-control study of early childhood caries in Australia. **Caries Res**, v.43, p.25-35, 2009.

SINTON J.; VALAITIS R.; PASSARELLI C.; SHEERAN D.; HESCH R. A systematic overview of the relationship between infant feeding caries and breast-feeding. **Ont Dent**, v.75, p.23-27, 1998.

TENUTA, L. M. A.; RICOMINI FILHO, A. P.; DEL BEL CURY, A. A.; CURY, J. Effect of sucrose on the selection of Mutans streptococci and lactobacilli in dental biofilm formed in situ. **Caries Res**, v.40, p.546-549, 2006.

THOMAS, E.L.; JEFFERSON, M. M.; JOYNER, R. E.; COOK, G. S.; KING, C. C. Leukocyte myeloperoxidase and salivary peroxidase: identification in human mixed saliva. **J Dent Res**, v.73, p.544-555, 1994.

TIBERIA, M. J.; MILNES, A. R.; FEIGAL, R. J.; MORLEY, K. R.; RICHARDSON, D. S.; CROFT, W. G.; CHEUNG, W. S. Risk factors for early childhood caries in Canadian preschool seeking care. **Pediatr Dent**, v.29, p.201-208, 2007.

TORNEY, P. H. Prolonged, On- demand Breastfeeding and Dental Decay- an investigation. **M Dent Sc**, Doubling, Irlanda, 1992.

VALAITIS, R.; HESCH, R.; PASSARELLI, C.; SHEEHAN, D.; SINTON, J. A systematic review of the relationship between breastfeeding and early childhood caries. **Can J Public Health**, v.91, p.411-417, 2000.

VALDÉS, V.; SÁNCHEZ, A.; LABBOK, M. **Manejo clínico da lactação. Assistência à nutriz e ao lactante**. Rio de Janeiro: Revinter, 1996.

VALE, G. C.; TABCHOURY, C. P. M.; ARTHUR, R. A.; DEL BEL CURY, A. A.; PAES LEME, A. F.; CURY, J. A. Temporal relationship between sucrose-associated changes in dental biofilm composition and enamel demineralization. **Caries Res**, v.41, p.406-412, 2007.

VALENTI, P.; BERLUTTI, F.; CONTE, M. P.; LONGHI, C.; SEGANTI, L. Lactoferrin functions: current status and perspectives. **J Clin Gastroenterol**, v.38, n.6 (Supl), p.S127-129, 2004.

VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. **J Dent Res**, v.73, n.3, p.672-681, 1994.

VAN PALESTEIN HELDERMAN, W. H.; SOE, W.; VAN'T HOF, M. A. Risk factors of early childhood caries in a Southeast asian population. **J Dent Res**, v.85, p.85-88, 2006.

WAMBIER, D. S.; BOSCO, V. L.; CUMAN, V.; SMIGUEL, O.; ELOY, T. C. Prevalência e distribuição de lesões de cárie em bebês. **Publ UEPG Ci Biol Saúde**, v.10, n.1, p.15-22, 2004.

WELSH, J.; MCCLELLAND, D. L. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res**, v.18, n.24, p.7213-7218, 1990.

ANEXO

ANEXO – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética HU—UFMA.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
COMITÊ ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO


Pesquisador (a) Responsável: **Cecilia Claudia Costa Ribeiro**
Equipe executora: **Cecilia Claudia Costa Ribeiro, Fernando Borba de Araújo, Marizélia Rodrigues Costa Ribeiro, Cláudia Maria Coelho Alves e Ana Margarida Nunes**
Tipo de Pesquisa: **Projeto de Pesquisa**
Registro do CEP: **337/06** Processo N°. **33104-1291/2006**
Instituição onde será desenvolvido: **núcleo de Extensão da Vila Embratel**
Grupo: **III**
Situação: **APROVADO**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão analisou na sessão do dia 17.11.2006 o processo N°. 33104-1291/2006, referente ao projeto de pesquisa: “**Associação entre aleitamento materno e cárie de estabelecimento precoce em crianças de 12-36 meses**”, tendo como pesquisadora responsável **Cecilia Claudia Costa Ribeiro**, cujo objetivo geral é “**Avaliar a relação entre a prática de amamentação prolongada e a prevalência de lesões de cárie de estabelecimento precoce**”. Na metodologia; Trata-se de um estudo do tipo coorte retrospectivo.

Lembramos a V.Sª que o sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalidade alguma e sem prejuízo ao seu cuidado, e deve receber uma cópia do TCLE, na íntegra, por ele assinado. O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em 09/02/2008 e ao término do estudo, gravado em CD ROM.

São Luis, 16 de março de 2007


Wildoberto Batista Gurgel
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da UFMA
Ethica homini habitat est

Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
Rua Barão de Itapary, 227 Centro C.E.P. 65. 020-070 São Luís – Maranhão Tel: (98) 3219-1223
E-mail huufma@huufma.br

APÊNDICES

Apêndice 1 – Termo de Consentimento

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM SAÚDE MATERNO INFANTIL**

Projeto: Potencial acidogênico do leite materno em crianças com cárie de estabelecimento precoce.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O seu filho _____ residente à _____, telefone: _____, bairro: _____, da cidade de São Luís, foi selecionado a participar de uma pesquisa onde serão feitos exames de sua boca para observar se têm cáries. Essa pesquisa tem como objetivo avaliar se o aleitamento materno administrado na hora que a criança quiser tem relação com o aparecimento muito cedo da doença cárie. Os instrumentais serão esterilizados para cada criança evitando contaminação. O exame será feito com luvas, máscaras e toucas descartáveis.

O exame constará inicialmente com a determinação do Índice de Placa Visível, posterior observação das lesões de cárie caso existam. Os procedimentos a serem seguidos não causam nenhum risco para o seu filho, pelo contrário, trazem os benefícios de: melhorar a higiene bucal deles e de serem acompanhados por pesquisadores que conhecem e podem ajudar a tratar e/ ou prevenir as doenças da boca, inclusive a cárie dental.

Além da avaliação de cárie, será avaliado como o leite humano é processado pela placa bacteriana. Essa avaliação será executada em 1 (um) dente da boca de seu filho com um aparelho que mede a acidez da placa dental com e sem a administração de 1 gota de uma substância de sacarose a 10%. Este aparelho não traz nenhum risco a saúde da criança e nos ajudará a avaliar se o leite materno ajuda a provocar ou não cáries. Após a avaliação com a substância de sacarose a 10% seu filho será submetido a uma profilaxia (limpeza) e a colocação de flúor para proteção de seus dentes.

Os resultados serão usados para elaboração de um trabalho científico, apresentação em congressos, e a publicação em revistas e periódicos odontológicos além de divulgação nos meios de comunicação em massa, **sendo que o nome ou foto do seu filho não será mostrado**. Afirmamos que, mesmo com uma cópia original deste termo de consentimento, o (a) senhor (a) **tem direito de tirar o seu filho da pesquisa em qualquer momento, e caso isso ocorra, a criança não será prejudicada em seu tratamento.**

São Luís, ____/____/____

Responsável pela criança

Pesquisadores Responsáveis: _____

**Pierre Adriano Moreno Neves Fone: 32687716
End: Rua dos Acapus, quadra- 55, casa-24 Renascença I
São Luis - MA**

Cecilia Claudia Costa Ribeiro
Rua Júpiter, n. 12 apto. 1101 Renascença II – 32350839

Apêndice 2 – Ficha Clínica

Potencial acidogênico do leite materno em crianças com cárie de estabelecimento precoce.

FICHA CLÍNICA

Grupo: () livre de cárie () com CEP

1) Identificação pessoal:

Nome: _____
Sexo: () masculino () feminino
Idade: _____ Peso: _____ Altura: _____
Posição em relação aos irmãos: _____
Parto: () cesariano () normal
Idade da Mãe: _____
Nível de Instrução da mãe: (escolaridade) _____
Profissão da Mãe: _____
Renda Familiar: _____
Quem fica em casa com a criança durante o dia: _____

2) História médica:

2.1 - Já esteve internado? () sim Porque? _____
() não

2.2 - Já teve alguma dessas doenças: (quantas vezes?)

Infecção de garganta:	() sim _____ vezes	() não
Infecção de ouvido:	() sim _____ vezes	() não
Gripe ou Resfriado:	() sim _____ vezes	() não
Diarréia:	() sim _____ vezes	() não
Asma:	() sim _____ vezes	() não
Pneumonia:	() sim _____ vezes	() não

2.3 - Alguma manifestação de alergia?

Pele:	() sim _____ vezes	() não
Respiratória:	() sim _____ vezes	() não
Medicamentos:	() sim Qual? _____	() não

2.4 - Alterações intestinais:

Cólicas:	() sim _____ vezes	() não
Intolerância:	() sim a que _____	() não

2.5 - Refluxo/ Vômitos: () sim _____ vezes () não

2.6 - Usa medicamentos com frequência? () sim () não

2.7 - Caso use normalmente qual o medicamento: _____

2.8 - Nos últimos seis meses quantas vezes foi administrado este remédio:

() 1 vez () 2 vezes () 3 vezes () mais de 3 vezes

2.9 - Qual a frequência de tomada deste medicamento:

() 6 em 6 horas () 8 em 8 horas
() 12 em 12 horas () outra _____

3) Aleitamento materno & erupção dentária:

3.1 - Tempo de aleitamento exclusivo: _____ meses

3.2 - É amamentado durante a noite: () sim () não

3.3 - Em caso positivo quantas vezes durante a noite: _____ vezes

3.4 – Quanto tempo dura a mamada: _____ minutos

3.5-Época da erupção do primeiro dente: _____ meses

4) Higiene oral:

4.1-Já recebeu informação sobre saúde bucal? () sim () não

4.2- Em caso positivo quem informou: () médico
() dentista
() outros _____

4.3-Já foi ao dentista? () sim () não

4.4- Em caso positivo. Por quê? () cárie () prevenção
() trauma dental

4.5- Quando começou a escovar os dentes:

- () aos 6 meses
- () 7 meses- 12 meses de idade
- () 13 meses a 2anos de idade
- () após 2 anos
- () ainda não escova

4.6-Quantidade de escovações dia;

- () 1 vez () 2 vezes () 3 vezes () mais que 3 vezes

4.7- Quem escova o dente do seu filho:

- () a mãe () pai () escova sozinho
- () irmão menor de idade () outros :quem?_____

4.8-Usa creme dental fluoretado: () sim . Qual: _____
() não

4.9-Usa escova dental individual: () sim () não

5- Dieta:

5.1- Número de refeições principais salgadas: () 1 () 2 () 3 () 4

5.2- Número de lanches: () 1 () 2 () 3 () mais de 3

5.3- Costuma beliscar entre as refeições (sacarose)? () não
() 1 vez () 2 vezes () 3 vezes () mais de 3 vezes

5.4- Usa Mamadeira? () sim. Conteúdo _____ () não

5.5- Em caso afirmativo quantas vezes ao dia:

- () 1 vez () 2vezes () 3 vezes () mais que 3 vezes

5.6 –Em caso afirmativo, quantas vezes à noite:

- () 1 vez () 2 vezes () 3 vezes () mais que 3 vezes

5.7 - Usa papa ou mingau em copo, xícara ou na colher? () não

- () sim 1 vez () sim 2 vezes () sim mais de 3 vezes

6.0- Diário alimentar do dia anterior

AFERIÇÃO DE PH:

FASE	pHdescanso	pH5min	pH30min (final)
Leite			
Sacarose			

Nome: _____

Data: _____

Exame Clínico

	V	P	M	D	O
55					
54					
53					
52					
51					

V P M D O

61					
62					
63					
64					
65					

V P M D O

75					
74					
73					
72					
71					

V P M D O

81					
82					
83					
84					
85					

Observações Clínicas

55	
54	
53	
52	
51	

61	
62	
63	
64	
65	

75	
74	
73	
72	
71	

81	
82	
83	
84	
85	

Códigos

- 0** – Superfície hígida; selante
- 1** – Mancha branca ativa
- 2** – Mancha branca inativa
- 3** – Cavidade ativa
- 4** – Cavidade inativa
- 5** – Restauração
- 6** – Restauração alterada (defeituosa)
- 7** – Restauração fraturada
- 8** – Recidiva de lesão de cárie
- 9** – Destruição coronária
- 10** – Fístula

Perfil do Paciente com relação à Doença Cárie

- () Livre de Cárie
- () Sem fatores etiológicos
- () Com fatores etiológicos
- () Com Experiência de Cárie
- () Sem atividade
- () Com atividade
- () Sem necessidades invasivas
- () Com necessidades invasivas

6 ARTIGO CIENTÍFICO

6.1 Classificação Qualis do Periódico na área de Medicina II

ISSN	TÍTULO	ESTRATO	ÁREA DE AVALIAÇÃO
0008-6568	Caries Research	B1	MEDICINA II

6.2 Normas editoriais

Caries Research

Aims and Scope

'Caries Research' is an international journal, the aim of which is to promote research in dental caries and related fields through publication of original research and critical evaluation of research findings. The journal will publish papers on the aetiology, pathogenesis, prevention and clinical control or management of dental caries. Papers on health outcomes related to dental caries are also of interest, as are papers on other disorders of dental hard tissues, such as dental erosion. Aspects of caries beyond the stage where the pulp ceases to be vital are outside the scope of the journal. The journal reviews papers dealing with natural products and other bacterial inhibitors against specific criteria, details of which are available from the Editor.

Submission

Manuscripts written in English should be submitted at

[Online Manuscript Submission](#)

Should you experience problems with your submission, please contact:

Prof. David Beighton
(Editor-in-Chief, Caries Research)
Department of Microbiology
The Henry Wellcome Laboratories for Microbiology and Salivary Research
KCL Dental Institute, Floor 17, Guys Tower
London Bridge SE1 9RT (UK)
Tel. +44 2071887465
Fax +44 2071887466
david.beighton@kcl.ac.uk

Copies of any 'in press' papers cited in the manuscript must accompany the submission. Manuscripts reporting on clinical trials must be accompanied by the CONSORT checklist (see below).

Conditions

All manuscripts are subject to editorial review. Manuscripts are received with the explicit

understanding that the data they contain have not previously been published (in any language) and that they are not under simultaneous consideration by any other publication.

Submission of an article for publication implies the transfer of the copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the property of 'Caries Research' and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher.

It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc., from other publications.

Types of Papers

Original papers or Short Communications are reports of original work (including systematic reviews and meta-analyses). Both have the structure outlined below but for Short Communications the abstract should be less than 100 words and the manuscript should not exceed 3 printed pages, equivalent to about 9 manuscript pages (including tables, illustrations and references).

Reviews can have a freer format but should nevertheless commence with a Title page, an Abstract and an Introduction defining the scope.

Current topics are concise articles that present critical discussion of a topic of current interest, or a fresh look at a problem, and should aim to stimulate discussion.

Letters to the Editor, commenting on recent papers in the journal, are published occasionally, together with a response from the authors of the paper concerned.

Preparation of Manuscripts

Text should be one-and-a-half-spaced, with wide margins. All pages should be numbered, starting from the title page. A conventional font, such as Times New Roman or Arial, should be used, with a font size of 11 or 12. Avoid using italics except for Linnaean names of organisms and names of genes.

Manuscripts should be prepared as a text file plus separate files for illustrations. The text file should contain the following sequence of sections: Title page; Declaration of interests; Abstract; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; Legends; Tables. Each section should start on a new page, except for the body of the paper (Introduction to Acknowledgements), which should be continuous.

Title page: The first page of each manuscript should show, in order:

- the title, which should be informative but concise;
- the authors' names and initials, without degrees or professional status, followed by their institutes;
- a short title, maximum length 60 characters and spaces, for use as a running head;
- a list of 3-10 key words, for indexing purposes;
- the name of the corresponding author and full contact details (postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address).

Declaration of Interests: Potential conflicts of interest should be identified for each author or, if there are no such conflicts, this should be stated explicitly. Conflict of interest exists where an author has a personal or financial relationship that might introduce bias or affect their judgement. Examples of situations where conflicts of interest might arise are restrictive conditions in the funding of the

research, or payment to an investigator from organisations with an interest in the study (including employment, consultancies, honoraria, ownership of shares). The fact that a study is conducted on behalf of a commercial body using funds supplied to the investigators' institution by the sponsor does not in itself involve a conflict of interest. Investigators should disclose potential conflicts to study participants and should state whether they have done so.

The possible existence of a conflict of interest does not preclude consideration of a manuscript for publication, but the Editor might consider it appropriate to publish the disclosed information along with the paper.

Abstract: The abstract should summarise the contents of the paper in a single paragraph of no more than 250 words (to ensure that the abstract is published in full by on-line services such as PubMed). No attempt should be made to give numerical results in detail. References are not allowed in the abstract.

Introduction: This section should provide a concise summary of the background to the relevant field of research, introduce the specific problem addressed by the study and state the hypotheses to be tested.

Materials and Methods (or Subjects and Methods): All relevant attributes of the material (e.g. tissue, patients or population sample) forming the subject of the research should be provided. Experimental, analytical and statistical methods should be described concisely but in enough detail that others can repeat the work. The name and brief address of the manufacturer or supplier of major equipment should be given.

Statistical methods should be described with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, findings should be quantified and appropriate measures of error or uncertainty (such as confidence intervals) given. Sole reliance on statistical hypothesis testing, such as the use of P values, should be avoided. Details about eligibility criteria for subjects, randomization and the number of observations should be included. The computer software and the statistical methods used should be specified. See Altman et al.: Statistical guidelines for contributors to medical journals [Br Med J 1983;286:1489-93] for further information.

In any paper involving microradiography, the following information must be included: the radiation source and filters used; the kV used (this determines the wavelength of radiation and hence the validity of using Angmar's equation).

Papers on experimental enamel caries should show that the lesions retain a relatively well-preserved surface layer, i.e. are not surface-softened lesions. Proof of surface integrity can be provided either as illustrations in the paper or as supplementary material for the reviewers. Transverse microradiography, polarized-light microscopy of section immersed in water or backscattered scanning electron microscopy of a polished cross-sections can be used to provide the necessary proof. To allow the nature of experimental changes to be assessed, microradiographs or micrographs should be provided to show part of the experimental lesion and the adjacent control (e.g. Figure 2 of Zaura et al.: Caries Res 2007;41:489-492). Again, these images can be provided as part of the paper or as supplementary material for review purposes.

Manuscripts reporting studies on human subjects should include evidence that the research was ethically conducted in accordance with the Declaration of Helsinki ([World Medical Association](#)). In particular, there must be a statement in Materials and Methods that the consent of an appropriate ethical committee was obtained prior to the start of the study, and that subjects were volunteers who had given informed, written consent.

Clinical trials should be reported according to the standardised protocol of the [CONSORT Statement](#). The CONSORT checklist must be submitted together with papers reporting clinical trials.

In studies on laboratory animals, the experimental procedures should conform to the principles laid down in the [European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes](#) and/or the [National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#).

Unless the purpose of a paper is to compare specific systems or products, commercial names of clinical and scientific equipment or techniques should only be cited, as appropriate, in the 'Materials and Methods' or 'Acknowledgements' sections. Elsewhere in the manuscript generic terms should be used.

Results: Results should be presented without interpretation. The same data should not be presented in both tables and figures. The text should not repeat numerical data provided in tables or figures but should indicate the most important results and describe relevant trends and patterns.

Discussion: This section has the functions of describing any limitations of material or methods, of interpreting the data and of drawing inferences about the contribution of the study to the wider field of research. There should be no repetition of preceding sections, e.g. reiteration of results or the aim of the research. The discussion should end with a few sentences summarising the conclusions of the study. However, there should not be a separate 'Conclusions' section.

Acknowledgements: Acknowledge the contribution of colleagues (for technical assistance, statistical advice, critical comment etc.) and also acknowledge the source of funding for the project. The position(s) of author(s) employed by commercial firms should be included.

Legends: The table headings should be listed first, followed by the legends for the illustrations.

Tables: Tables should be numbered in Arabic numerals. Each table should be placed on a separate page. Tables should not be constructed using tabs but by utilising the table facilities of the word-processing software.

Illustrations:

- Illustrations should be numbered in Arabic numerals in the sequence of citation. Figure numbers must be clearly indicated on the figures themselves, outside the image area.
- Black and white half-tone illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800-1200 dpi.
- Figures with a screen background should not be submitted.
- When possible, group several illustrations in one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm).

Color Illustrations

Online edition: Color illustrations are reproduced free of charge. In the print version, the illustrations are reproduced in black and white. Please avoid referring to the colors in the text and figure legends.

Print edition: Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at CHF 760.00 per page.

References

Reference to other publications should give due acknowledgement to previous work; provide the reader with accurate and up-to-date guidance on the field of research under discussion; and provide evidence to support lines of argument. Authors should select references carefully to fulfil these aims without attempting to be comprehensive.

Cited work should already be published or officially accepted for publication. Material submitted for publication but not yet accepted should be cited as 'unpublished results', while unpublished observations communicated to the authors by another should be cited as 'personal communication', with credit in both cases being given to the source of the information. Neither unpublished nor personally communicated material should be included in the list of references. Abstracts more than 2 years old and theses should not be cited without a good reason, which should be explained in the covering letter accompanying the paper.

References should be cited by naming the author(s) and year. Where references are cited in parenthesis, both names and date are enclosed in square brackets. Where the author is the subject or object of the sentence, only the year is enclosed in brackets.

One author: [Frostell, 1984] or Frostell [1984].

Two authors: [Dawes and ten Cate, 1990] or Dawes and ten Cate [1990].

More than two authors: [Trahan et al., 1985] or Trahan et al. [1985].

Several references cited in parenthesis should be in date order and separated by semi-colons: [Frostell, 1984; Trahan et al., 1985; Dawes and ten Cate, 1990].

Material published on the World Wide Web should be cited like a reference to a print publication, and the URL included in the reference list (not in the text), together with the year when it was accessed.

The reference list should include all the publications cited in the text, and only those publications. References, formatted as in the examples below, should be arranged in strict alphabetical order. All authors should be listed. For papers by the same authors, references should be listed according to year. Papers published by the same authors in the same year should be distinguished by the letters a, b, c, ... immediately following the year, in both the text citation and the reference list. For abbreviation of journal names, use the Index Medicus system. For journals, provide only the year, volume number and inclusive page numbers.

Examples

(a) *Papers published in periodicals*: Lussi A, Longbottom C, Gygax M, Braig F: Influence of professional cleaning and drying of occlusal surfaces on laser fluorescence in vivo. *Caries Res* 2005;39:284-286.

(b) *Papers published only with DOI numbers*: Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. *Int Arch Allergy Immunol* DOI: 10.1159/000063858.

(c) *Monographs*: Matthews DE, Farewell VT: *Using and Understanding Medical Statistics*. Basel, Karger, 1985.

(d) *Edited books*: DuBois RN: Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer; in Dannenberg AJ, DuBois RN (eds): *COX-2*. *Prog Exp Tum Res*. Basel, Karger, 2003, vol 37, pp 124-137.

(e) *Patents*: Diggins AA, Ross JW: Determining ionic species electrochemically. UK Patent Application GB 2 064 131 A, 1980.

(f) *World Wide Web*: Chaplin M: Water structure and behavior.

www.lsbu.ac.uk/water, 2004.

Digital Object Identifier (DOI)

S. Karger Publishers supports DOIs as unique identifiers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at www.doi.org

*Author's Choice*TM

Karger's Author's ChoiceTM service broadens the reach of your article and gives all users worldwide free and full access for reading, downloading and printing at www.Karger.com. The option is available for a one-time fee of CHF 2,750.00, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at www.karger.com/authors_choice.

NIH-Funded Research

The U.S. National Institutes of Health (NIH) mandates under the NIH Public Access Policy that final, peer-reviewed manuscripts appear in its digital database within 12 months of the official publication date. As a service to authors, Karger submits the final version of your article on your behalf to PubMed Central. For those selecting our premium [Author's Choice](#)TM service, we will send your article immediately upon publishing, accelerating the accessibility of your work without the usual embargo. More details on NIH's Public Access Policy is available [here](#).

Self-Archiving

Karger permits authors to archive their pre-prints (i.e. pre-refereeing) or post-prints (i.e. final draft post-refereeing) on their personal or institution's servers, provided the following conditions are met: Articles may not be used for commercial purposes, must be linked to the publisher's version, and must acknowledge the publisher's copyright. Authors selecting Karger's [Author's Choice](#)TM feature, however, are also permitted to archive the final, published version of their article, which includes copyediting and design improvements as well as citation links.

Page Charges

There are no page charges for papers of seven or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). A charge of CHF 650.00 will be levied for each page in excess of the allotted seven printed pages. The allotted size of a paper is equal to approximately 21 typescript pages (including tables, illustrations and references).

Proofs

Unless indicated otherwise, proofs are sent to the first-named author and should be returned with the

least possible delay. Alterations made in proofs, other than the correction of printer's errors, are charged to the author. No page proofs are supplied to the author.

Reprints

Order forms and a price list are sent with the proofs. Orders submitted after this issue is printed are subject to considerably higher prices.

6.3 Artigo Completo

Avaliação do potencial acidogênico do leite materno em crianças com diferentes experiências de cárie

P.A.M. Neves^a, V. Monteiro-Neto^{b,f}, A.M. Nunes^{c,f}, L.M.A. Tenuta^{d,g}, J. A. Cury^{d,g}, C.C.C. Ribeiro^{c,e}

^aPrograma de Pós-Graduação em Saúde Materno-infantil; ^bDepartamento de Patologia; ^cDisciplina de Odontopediatria; ^dDisciplina de Bioquímica; ^eUniversidade Federal do Maranhão; ^fCentro de Ensino Universitário do Maranhão, São Luis, MA, Brasil.; ^gFaculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, Piracicaba, SP, Brasil.

Título resumido: Acidogenicidade do leite humano em crianças com e sem cárie

Palavras-chave: Cárie Dentária, Leite materno, Sacarose, pH.

Correspondência:

Cecilia Claudia Costa Ribeiro

Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Odontologia II. Campus Bacanga. São Luís, MA, Brasil. CEP- 65085-580. Tel.: +55-98-2109-8575. e-mail: cecilia_ribeiro@hotmail.com

Declaração de interesse: Os autores declaram não terem conflitos de interesse.

Resumo:

Tendo em vista que amamentação após 1 ano de idade tem sido apontada por alguns estudos como fator de risco à cárie de estabelecimento precoce (CEP), e que é desconhecido se o leite materno é metabolizado em um biofilme oral estruturado em crianças com CEP levando a quedas de pH, o objetivo desse estudo foi avaliar potencial acidogênico do leite no biofilme oral de lactentes não exclusivos com ou sem experiência de cárie, tendo como controle a sacarose. Medidas de pH do biofilme foram realizadas in vivo em 16 crianças (média de 35.23 meses de idade) divididas em dois grupos: livre de cáries (n=9) e com cárie de estabelecimento precoce (CEP) (n=7). Nos dois grupos foram coletadas amostras de saliva e biofilme para avaliação microbiológica. A acidogênicidade no biofilme oral foi avaliada de forma cruzada após amamentação ou gotejamento de solução de sacarose 10% nos dois grupos de crianças através de medições de pH (pH Descanso, pH Final, pH_{5min}, Máxima queda de pH e AUC_{6.5}) usando-se um microeletrodo de contato. Uma maior frequência de *Streptococcus mutans* foi encontrado no biofilme das crianças

aleitadas com CEP ($p < 0.05$). Na comparação entre crianças com ou sem cárie, o tratamento leite não apresentou nenhuma diferença para nenhuma das variáveis de pH, porém a sacarose provocou um maior $\Delta\text{pH}_{5\text{min}}$ no biofilme dos pacientes com CEP ($p = 0.0317$). Dentro de um mesmo grupo, a sacarose provocou uma maior queda de pH que o leite humano no biofilme de pacientes livre de cáries ($p = 0.0423$). Para os indivíduos CEP, a solução de sacarose também apresentou um potencial acidogênico maior que o leite para as variáveis $\text{pH}_{5\text{min}}$ ($p = 0.0308$), $\Delta\text{pH}_{5\text{min}}$ ($p = 0.018$) e $\text{AUC}_{6.5}$ ($p = 0.0104$). O leite humano não teve potencial acidogênico no biofilme oral de crianças amamentadas, independente da atividade da doença cárie. Em conjunto, esses dados dão suporte a hipótese de que o leite humano não seja cariogênico, e que o consumo de outros carboidratos deve ser considerado em crianças amamentadas com cárie precoce.

Introdução

O papel do leite humano na etiologia da cárie ainda é assunto controverso na literatura. Revisões sistemáticas sobre a relação entre amamentação e cárie de estabelecimento precoce (CEP) são inconclusivas, apontando tanto para falhas nos desenhos dos estudos quanto na consideração das variáveis confundidoras [Sinton et al., 1998; Valaitis et al., 2000].

Alguns estudos mais recentes mostram que o aleitamento materno, após um ano de idade, tem associação com o estabelecimento precoce da doença [Yonezu et al., 2006 a,b, Van Palenstein et al., 2006]; enquanto outros refutam a relação entre aleitamento prolongado e a cárie precoce [Rosenblatt e Zarzar, 2004; Kramer et al., 2007; Lida et al., 2007].

Evidências a partir de estudos *in vitro* [Erickson e Mazhari, 1999] e *in situ* [Araújo et al., 1997] não mostram um potencial cariogênico do leite humano, quando usado de forma isolada. Contudo, na prática de aleitamento, o leite como único nutriente da dieta é recomendado somente até os 6 meses de vida [OMS/UNICEF, 2003], assim a subsequente introdução de novas fontes de carboidratos na dieta pode representar variáveis confundidoras ao se analisar o hábito de aleitamento prolongado como fator de risco à cárie.

O potencial acidogênico do leite humano já foi avaliado em um estudo, o qual não mostrou quedas significativas de pH na placa bacteriana coletada de crianças livres de cárie [Erickson e Mazhari, 1999]. Entretanto, há indícios *in vitro*, que após um período de adaptação do biofilme, a lactose possa sofrer metabolismo e levar a formação de ácidos nesse biofilme, porém com quedas de pH bem inferiores a glicose [Birkhed et al., 1993]. Sabe-se que consumo de açúcares está relacionado à composição do biofilme oral em

crianças com cárie precoce [Rodrigues e Sheiham, 2000; Nobre dos Santos et al., 2002], mas ainda é desconhecido se nesse biofilme cariogênico o leite humano teria um potencial acidogênico, sinalizando que a amamentação possa contribuir para quedas de pH em um biofilme já maduro naquelas crianças.

Assim o objetivo do presente estudo foi avaliar se o leite humano tem potencial acidogênico no biofilme oral em crianças com ou sem atividade de cárie, tendo como controle a sacarose.

Material e Método

Seleção da amostra

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (protocolo nº 33104-1291/2006) e os pais ou tutores legais, responsáveis pelas crianças que participaram do estudo leram e assinaram um consentimento informado por escrito. Todas as crianças do estudo que precisaram de tratamento odontológico foram encaminhadas para atendimento na Clínica de Odontopediatria da UFMA.

O cálculo amostral foi realizado a partir de um estudo piloto com 8 lactentes não-exclusivos, sendo 4 com CEP e 4 sem a doença. Foram comparados as médias e os desvios padrões de Área sobre a curva de pH6.5 ($AUC_{6.5}$) nas crianças livres de cárie e nas crianças com cárie precoce. Esta variável foi calculada através de um software específico para pH do biofilme oral [Larsen e Pearce, 1997]. O teste-t para amostras não-pareadas foi utilizado adotando-se um nível de significância de 5% e poder do teste de 80%, totalizando um n=5 crianças em cada grupo. Considerando a possibilidade de perdas, selecionou-se 10 crianças para cada grupo.

A amostra foi obtida após visita a 07 creches comunitárias em bairros periféricos no município de São Luís – MA, Brasil, sendo convidados a participar do estudo todos os lactentes não-exclusivos com idade superior a 24 meses, até se chegar ao n adequado. Do total de 20 crianças selecionadas, 4 crianças não compareceram ao experimento no dia marcado e a amostra final constou de 9 crianças livre de cáries e 7 crianças com CEP.

No exame clínico da cavidade bucal das crianças foi utilizado o índice ceo (cariados, perdidos e obturados) indicado pela OMS [1987], além de avaliação das lesões de cárie não cavitadas [Nyvad et al., 2003]. As crianças foram consideradas livres de cárie quando não tinham nenhuma cavitação ou lesão não cavitada, e como com CEP se apresentassem pelo menos uma dessas lesões, cavitadas ou não.

Procedimentos microbiológicos

Amostras de biofilme e saliva não-estimulada foram coletadas para contagem de microrganismos totais, *S. mutans* e *Lactobacillus spp.* nos grupos livre de cárie e CEP. Para tanto as amostras foram processadas e inoculadas em duplicata em agar mitis salivarius (MSA – Difco BD, Sparks, EUA) com adição de 20% de sacarose, 0,2 unidades/mL de bacitracina e 1% de telurito de potássio (MSB) para contagem de *Streptococcus mutans* [Gold et al., 1973]; agar Rogosa (Difco BD, Sparks, EUA) para contagem de *Lactobacillus spp.* [Rogosa et al., 1951] e BHI (Brain Heart Infusion Agar – Difco BD, Sparks, EUA) suplementado com 5% de sangue de carneiro para contagem de microrganismos totais. As placas de agar Rogosa e agar sangue foram incubadas em anaerobiose por 48 horas [Jurgensen e Jurgensen, 1982], enquanto que as placas de MSB foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ pelo mesmo período de tempo [Gold et al., 1973]. Os valores para as amostras de biofilme foram expressas em UFC por miligrama (UFC/mg) e para as amostras de saliva em UFC por mililitro (UFC/mL). Para confirmação da espécie, os *S. mutans* foram identificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), segundo a metodologia de Flório (2003), usando-se como controle, cepa padrão de *S. mutans* (ATCC 00446).

Medidas de pH no Biofilme Oral

Nas duas etapas do experimento foi solicitado aos pais ou responsáveis legais pelas crianças que cessassem qualquer medida de higiene oral por 72 horas antes da aferição de pH para formação de um biofilme oral espesso [Lingström et al., 2000]. As crianças também todas deveriam estar em jejum de no mínimo 2 horas antes da primeira medição para se evitar que consumos de alimentos pudessem interferir nos resultados.

O pH do biofilme oral foi medido utilizando um microeletrodo de toque (Beetrode, NMPH3 08J, W. P. Instruments, New Haven, Conn., EUA) e um eletrodo de referência de vidro (Orion Res Inc., Cambridge, Mass., EUA) conectados a um medidor de pH (Orion 4 Star Thermo Scientific). Uma ponte de referencia salina foi obtida através dos responsáveis pelas crianças: com uma mão, mantinham contato com o corpo da criança, e com a outra mão, inseriam o dedo indicador em uma placa de Petri contendo solução de cloreto de potássio 3 Molar (KCl 3M) e o eletrodo de referência de vidro.

Após a calibração do aparelho em tampões de pH 4.0 e 7.0, a aferição do pH do biofilme foi realizada com a inserção da ponta do microeletrodo diretamente no biofilme oral. Antes do experimento, foi medido o pH descanso (pH_{descanso}) do biofilme dental em um dente teste escolhido entre os que apresentassem maior quantidade de placa visível. Após essa medição inicial, a criança foi amamentada e foi aferido, no mesmo local, o pH após 5 (pH_{5min}) e 30 (pH_{final}) minutos do término da amamentação. De forma cruzada na outra etapa do

experimento, com intervalo de duas semanas, avaliou-se a queda de pH no biofilme oral após gotejamento de solução de sacarose 10%. Novamente foi aferido o pH de descanso do biofilme, em seguida, foram gotejadas 3 (três) gotas da solução de sacarose a 10% no dente teste, e feitas as aferições de pH semelhante à fase leite.

Com os dados de pH registrados, foram tabulados os valores de $\text{pH}_{\text{descanso}}$, pH após 5 minutos ($\text{pH}_{5\text{min}}$), pH após 30 minutos (pH_{final}), variação de pH em 5 minutos ($\Delta\text{pH}_{5\text{min}}$) e área sobre a curva de pH6,5 ($\text{AUC}_{6.5}$) nas duas fases do experimento para posterior análise estatística.

Análise estatística

Para análise estatística, a unidade experimental foi o voluntário. Inicialmente todas as variáveis avaliadas (UFC/mg, UFC/ml, $\text{pH}_{\text{baseline}}$, $\text{pH}_{5\text{min}}$, pH_{final} , $\Delta\text{pH}_{5\text{min}}$ e $\text{AUC}_{6.5}$) foram submetidas ao teste de Shapiro Wilk para verificação da normalidade dos dados. As variáveis $\text{pH}_{\text{baseline}}$, $\text{pH}_{5\text{min}}$, pH_{final} não violaram este pressuposto e foram submetidos aos testes t de Student pareado, para comparação do tratamento dentro de um mesmo grupo, e não pareado, para comparação entre os grupos livre ou com CEP. As variáveis que não apresentaram distribuição normal (UFC/mg, UFC/ml, $\Delta\text{pH}_{5\text{min}}$ e $\text{AUC}_{6.5}$) foram transformadas em Log10 pelo método de Box e Cox, ainda assim violaram o princípio da normalidade, então foram submetidos a testes não paramétricos, sendo o de Wilcoxon para os dados pareados e o de Mann-Whitney para os dados não-pareados.

O Software Biostat 3.0 (Instituto Mamirauá, Belém, PA, Brasil) foi utilizado para realização destas análises adotando-se um nível de significância de 5%.

Resultados

Com relação à análise microbiológica, os resultados mostraram uma maior frequência de *Streptococcus mutans* no biofilme e saliva de pacientes CEP, com diferença significativa quando comparada ao grupo livre de cáries ($p < 0.05$). Todos os pacientes CEP (100%) e apenas 2 pacientes livre de cáries (22%) apresentaram amostras de biofilme e saliva colonizadas por este microorganismo (Tabela 1).

Na comparação entre os grupos de crianças com e sem cárie, o tratamento com leite não apresentou diferença estatística para nenhuma das variáveis de pH observadas ($p > 0.05$). Porém, a solução de sacarose provocou um maior $\Delta\text{pH}_{5\text{min}}$ no biofilme dos pacientes CEP ($p = 0.0317$) (Tabela 2).

Na comparação entre os tratamentos dentro de um mesmo grupo, a sacarose provocou maior queda de pH no biofilme de pacientes livre de cáries que o leite humano ($p = 0.0423$). Os resultados também mostraram que para os indivíduos CEP, a sacarose

apresentou um potencial acidogênico maior que o leite ao se comparar as variáveis $\text{pH}_{5\text{min}}$ ($p=0.0308$), $\Delta\text{pH}_{5\text{min}}$ ($p= 0.018$) e $\text{AUC}_{6.5}$ ($p=0.0104$)(Tabela 2; Figura 1).

Discussão

A composição distinta do biofilme oral nas crianças livres de cárie e com cárie precoce foi mostrada através dos dados microbiológicos. Essa diferença na composição do biofilme oral confirma estudos anteriores, os quais mostram uma alteração ecológica da placa bacteriana no processo da doença, com predominância de bactérias acidogênicas e acidúricas como os *Streptococcus mutans* [Marsh, 2006].

Em relação ao pH de descanso, neste estudo não se observou diferença entre os grupos com ou sem cárie precoce. Estes dados corroboram os achados de Dong et al. [1999], que também não encontraram diferenças entre pH repouso no biofilme oral de crianças de 12 anos, com ou sem cárie. Nos dois estudos, um período de no mínimo 48 horas sem procedimentos de higiene oral para formação de biofilme, pode ter colaborado para um amadurecimento do mesmo nas crianças sem a doença, e assim contribuído para não encontrarmos diferença entre os grupos, comumente encontrada em estudos *in situ* [Ribeiro et al., 2005; Aires et al., 2006].

Na comparação do potencial acidogênico do leite humano nos biofilmes entre os grupos de crianças livres de cárie e com cárie precoce da infância, não foi observada diferença para nenhuma das variáveis de pH analisadas. Os dados confirmam os achados de Erickson e Mazhari [1999] em crianças livres de cárie. Os dados em crianças com cárie precoce com biofilme amadurecido, não corroboram os achados de Birkhed e colaboradores [1993], que mostraram num biofilme já adaptado, que o lactose foi metabolizada, levando a quedas de pH. As condições experimentais distintas entre os estudos, por aquele se tratar de biofilme formado *in vitro* usando a lactose, e no presente estudo o biofilme maduro ser uma condição *in vivo* em crianças amamentadas e com cárie, pode ter sido a razão das divergências encontradas entre os desfechos.

A cariogenicidade do biofilme, no presente estudo representado por placa bacteriana madura em crianças com lesões de cárie ativas, só teve interferência no potencial de queda de pH para a sacarose. A maior frequência de isolamento de *S. mutans* no biofilme oral pode ter sido uma das razões para explicar o maior metabolismo para a sacarose nas crianças com cárie que nas livres da doença. A relação entre mutans e processo de desmineralização dentária pela produção de ácidos a partir do metabolismo da sacarose vem sendo constantemente mostrada na literatura [Tenuta et al., 2006; Marsh, 2006; Vale et al., 2007].

Nesse estudo, mesmo após administração da sacarose a 10%, os valores médios de pH foram inferiores ao pH crítico de dissolução do esmalte ($\text{pH} > 5,5$). As aferições de pH no

período diurno, durante o qual o fluxo e a capacidade tampão salivar são maiores, podem ter contribuído com esses achados [van Houte, 1994]. Outros estudos que avaliaram quedas de pH com a sacarose em voluntários com diferentes experiências de cárie também não diferiram dos resultados aqui apresentados [Birkhed et al., 1993; Dong et al., 1999].

Nas análises pareadas dos tratamentos dentro de um mesmo grupo, o leite não levou a quedas de pH em nenhum dos grupos de crianças amamentadas. A sacarose levou a quedas significativas de pH após o período de 5 min, sendo a significância ainda maior para o grupo de crianças com cárie precoce ($p=0.002$, dados não apresentados). Em comparação ao leite, a sacarose, também mostrou queda de pH significativa para ambos os grupos de crianças. Entretanto, essa observação foi mais evidente, para o biofilme amadurecido em crianças com cárie, no qual diferenças foram significativas para a maioria dos desfechos de acidogenicidade do biofilme oral avaliadas.

Em resumo, o leite humano não teve potencial acidogênico no biofilme oral de crianças amamentadas e a sacarose levou a quedas de pH, sendo estas maiores no biofilme do grupo de crianças com cárie precoce. Em conjunto, esses dados dão suporte a hipótese de que o leite humano não é cariogênico, e que o consumo de outros carboidratos deve ser considerados em crianças amamentadas com cárie precoce.

Agradecimentos

À FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão) e Bolsa CAPES pelo financiamento desta pesquisa.

Referências

Aires CP, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Cury JA: Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed *in situ* and on enamel demineralization. *Caries Res* 2006;40:28-32.

Araujo FB, Cury JA, Araujo DR, Velasco LFL: Estudo *in situ* da cariogenicidade do leite humano: aspectos clínicos. *Rev ABO Nac* 1997;4:42-44.

Birkhed D, Imfeld T, Edwardsson S: pH changes in human dental plaque from lactose and milk before and after adaptation. *Caries Res* 1993;27:43-50.

Dong YM, Pearce EIF, Yue L, Larsen MJ, Gao XJ, Wang JD: Plaque pH and associated parameters in relation to caries. *Caries Res* 1999;33:428-436.

Erickson PR, Mazhari E. Investigation of the role of human breast milk in caries development. *Pediatr Dent* 1999;21(2):86-90.

Flório FM. Padrão de colonização por estreptococos Grupo mutans em crianças submetidas ou não a Programa em promoção de saúde bucal. 2003. 664f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

Gold OG, Jordan HV, Van Houte J: A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1973;18:1357-1364.

Jurgensen CA, Jurgensen LD: Copper oxidation, an alternative method for obtaining anaerobiosis (in portuguese). *Rev Bras Patol Clin* 1982;8:58-63.

Kramer MS, Vanilovich I, Matush L, Bogdanovich N, Zhang X, Shishko g, Muller-Bolla M, Platt RW: The Effect of Prolonged and Exclusive Breast-feeding and Dental Caries in Early Scholl-Age Children. *Caries Res*.2007;41:484-88.

Larsen MJ , Pearce EIF: A computer program for correlating dental plaque pH values, cH+, plaque titration, critical pH, resting pH and the solubility of enamel apatite. *Arch Oral Biol* 1997;42:475-480.

Lida H, Auinger P, Billings RJ, Weitzman M: Association between infant breastfeeding and early childhood Caries in the United States. *Pediatrics*. 2007;120:944-e952.

Lingström P, van Ruyven FOJ, van Houte j, Kent R: The pH of dental plaque in its relation to early enamel caries and dental plaque flora in humans. *J Dent Res* 2000;79(2):770-777.

Marsh PD: Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *Oral Health* 2006;6:1-7.

Nobre dos Santos M, Melo dos Santos L, Francisco SB, Cury JA: Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. *Caries Res* 2002;36:347-352.

Nyvad B, Machiulskiene V, Baelum V: Construct and predictive validity of clinical caries diagnostic criteria assessing lesion activity. *J Dent Res* 2003;82(Suppl 2):117-122.

Organização Mundial de Saúde, Fundação das Nações Unidas para Infância - UNICEF. Estrategia Mundial para la Alimentación del Lactante y del Nino Pequeño. Ginebra, 2003:30p.

- Organização Mundial de Saúde: Oral Health Surveys. Basic Methods. Geneva, OMS, 1987.
- Ribeiro CCC, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Tenuta L M, Rosalen P L, Cury JA. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. *Br J Nutr* 2005;94:44-50.
- Rodrigues CS, Sheiham A: The relationships between dietary guidelines, sugar intake and caries in primary teeth in low income Brazilian 3-year-olds: a longitudinal study. *Int J Pediatr Dent* 2000;10: 47-55.
- Rogosa M, Mitchell JA, Wiseman RF: A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. *J Dent Res* 1951;30(5):682-689.
- Rosenblatt A, Zarzar P: Breast-feeding and early childhood caries: an assessment among Brazilian infants. *J Pediatr Dent*. 2004;14(6):439-445.
- Sinton J, Valaitis R, Passarelli C, Sheeran D, Hesch R. A systematic overview of the relationship between infant feeding caries and breast-feeding. *Ont Dent* 1998;75:23-27.
- Tenuta LMA, Ricomini Filho AP, Del Bel Cury AA, Cury J: Effect of sucrose on the selection of Mutans streptococci and lactobacilli in dental biofilm formed in situ. *Caries Res* 2006;40:546-549.
- Valaitis R, Hesch R, Passarelli C, Sheehan D, Sinton J: A systematic review of the relationship between breastfeeding and early childhood caries. *Can J Public Health*. 2000; 91:411-417.
- Vale GC, Tabchoury CPM, Arthur RA, Del Bel Cury AA, Paes Leme AF, Cury, JA: Temporal relationship between sucrose-associated changes in dental biofilm composition and enamel demineralization. *Caries Res* 2007;41:406-412.
- Van Houte J: Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 1994;73(3):672-681.
- Van Palestein Helderma WH, Soe W, van 't Hof MA: Risk factors of early childhood caries in a Southeast asian population. *J Dent Res* 2006; 85:85-88.
- Yonezu T, Yotsuya K, Yakushiji. Characteristics of Breast-fed children with Nursing Caries. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2006;47(4):161-5.
- Yonezu T, Ushida N, Yakushiji M. Longitudinal Study of Prolonged Breast-or Bottle-feeding on Dental Caries in Japanese Children. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2006;47(4):157-160.

Tabela 1: Comparação da microbiota entre os grupos livre de cárie e CEP (média±DP) nas amostras de biofilme e saliva*.

	BIOFILME (UFC/mg x 10 ⁶)		SALIVA (UFC/ml x 10 ⁶)	
	LIVRE	CEP	LIVRE	CEP
S mutans	0.29(±0.88)	0.46 (±0.67)	0.02(±0.072)	0.12 (±0.16)
Lactobacillus spp.	0.000008(±0.000016)	0.00001(±0.000023)	0.022(±0.068)	0.0028(±0.0069)

CEP- grupo cárie de estabelecimento precoce

* teste não-paramétrico U de Mann-Whitney

** p<0.05

Tabela 2: Comparação entre pH Descanso, pH Final, pH_{5min}, ΔpH_{5min} e AUC_{6.5} (Média ± DP) para os tratamentos com leite humano e sacarose nos dois grupos

	LIVRE		CEP	
	LEITE	SACAROSE	LEITE	SACAROSE
pH Baseline	6.45±0.23	6.72±0.47	6.66±0.45	6.89±0.38
pH_{5min}	6.41±0.29	6.24±0.81	6.54±0.53	5.97±0.34
pH Final	6.54±0.24	6.90±0.78	6.87±0.57	6.66±0.45
ΔpH_{5min}	0.04±0.28	0.48±0.62	0.13±0.52	0.93±0.54
AUC_{6.5}	3.38±3.62	7.33±10.41	3.27±3.55	7.93±5.67

ΔpH_{5min} – variação de pH em 5 minutos; AUC_{6.5}– área sobre a curva de pH 6.5;
 CEP- grupo cárie de estabelecimento precoce
 *p<0.05 (amostras pareadas);**p<0.05 (amostras não-pareadas)

Gráfico 1: Curvas obtidas das médias de pH do biofilme dental com sacarose e leite humano nos grupos livres de cáries e CEP.

