



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**EVOLUÇÃO DO MICROBIOMA ORAL HUMANO E O SEU
IMPACTO NA SAÚDE ORAL**

Trabalho submetido por

Inês Coimbra Batista Duarte

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2021



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**EVOLUÇÃO DO MICROBIOMA ORAL HUMANO E O SEU
IMPACTO NA SAÚDE ORAL**

Trabalho submetido por

Inês Coimbra Batista Duarte

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por

Professor Doutor Nuno Taveira

outubro de 2021

Dedicatória

Ao meu avô.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Nuno Taveira que tanto admiro pelo seu percurso profissional, pela exigência e a quem estou grata pela oportunidade de poder trabalhar sob a sua orientação.

Aos Professores de Biologia da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, por me terem permitido desenvolver espírito crítico e por me terem fornecido as ferramentas necessárias para explorar a minha infinita curiosidade no campo da biologia que me acompanhará para o resto da vida.

Aos meus incansáveis Pais, que impulsionaram e estimularam a minha natureza curiosa ao longo da vida e que nunca olharam a meios para que a minha formação fosse a melhor que eu poderia ter. Estarei eternamente grata pelo esforço, pela disponibilidade, pelo apoio e por terem acreditado no meu potencial mesmo quando eu não acreditei.

Ao meu irmão Pedro, por me mostrar o caminho errado e indicar o certo, pela preocupação e por me ter incentivado a dar o salto para esta etapa da minha vida.

Ao meu irmão por afinidade, Leonel Lima, por ter sido a minha voz da razão, a minha família e porto seguro durante estes anos.

À Inês Sá Pereira, pela paciência e pela amizade; a cada um dos Gardeners, dos Metralhas e dos Fabulosos pelo apoio, ajuda e amizade e à Inês Oliveira, que Biologia me deu, pela partilha de conhecimentos de Biologia Computacional ao longo deste projeto.

Ao João Baião, por me permitir ser Adriano, pelas “Vitominas” diárias de compreensão e por me ter demonstrado o significado de companheirismo.

À AAIUEM pelas pessoas que levo para a vida, pelos ensinamentos e pelo que contribuiu para estes serem, de facto, os melhores anos da minha vida

Resumo

Introdução: Os microrganismos estão presentes em todos os aspectos da vida humana e é possível associar a sua presença a estados de saúde ou de doença. Para além de microrganismos patogénicos, o próprio microbioma comensal tem a capacidade de alterar a forma como afeta o hospedeiro como consequência de disbiose ou alteração de outros fatores. Por estarem associados a diversas patologias sistémicas presentes nos dias de hoje, é de extrema importância a sistematização no que toca à identificação e quantificação dos microrganismos integrantes da cavidade oral, tendo em conta as variações que ocorrem ao longo das diferentes faixas etárias e em diferentes grupos étnicos e verificar se existe alguma correlação entre essas variáveis.

Resultados: O microbioma oral das crianças é semelhante ao da progenitora até ao primeiro ano de vida, verificando-se a transmissão vertical do microbioma. A complexidade do microbioma oral das crianças aumenta gradualmente através da amamentação, erupção dentária e introdução de alimentos sólidos na alimentação. A espécie *Streptococcus mutans* está associada a índice de cárie elevado. A localização geográfica revelou ter influência na composição do microbioma oral.

Materiais e Métodos: Foi realizada uma pesquisa na base de dados *PubMed*, incluindo artigos primários publicados entre 2018 e 2021 em inglês.

Conclusão: Apesar das variações no microbioma oral ao longo da vida e em diferentes regiões geográficas, estudos adicionais são necessários para ser possível determinar um padrão de variação.

Palavras-chave: *oral microbiome in children; oral microbiome in the elderly; evolution of the oral commensal microbiome; oral microbiome and oral health; 16S rRNA; Next Generation Sequencing (NGS).*

Abstract

Introduction: Microorganisms are present in all aspects of human life. It is now possible to correlate present microorganisms with states of health or disease. Since several microorganisms within the oral microbiota are associated with several systemic diseases, microorganism identification and classification is considered to be of utmost importance. It is also mandatory to be able to verify if there is a consensus concerning the microbiota between ethnic groups and different age groups.

Results: Children's oral microbiome is similar to their mothers' during the first year of life, showing evidence of vertical transfer of the oral microbiome. The complexity of children's oral microbiome gradually increases through breastfeeding, tooth eruption and the introduction of solid food in their diet. *Streptococcus mutans* is associated with dental caries. The geographical location has an influence on the composition of one's oral microbiome.

Materials and Methods: This research included primary studies in english from 2018 and 2021 on the online platform *PubMed*.

Conclusion: Despite the differences found in the human oral microbiome throughout life and between regions, further studies are required in order to be able to determine a pattern of variation.

Key-words: *oral microbiome in children; oral microbiome in the elderly; evolution of the oral commensal microbiome; oral microbiome and oral health; 16S rRNA; Next Generation Sequencing (NGS).*

Índice

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Introdução | 15 |
| II. Materiais e Métodos | 17 |
| III. Desenvolvimento..... | 19 |
| 1. Metodologias de amplificação do ADN e de sequenciação | 19 |
| 1.1. Amplificação do ADN por Reação de amplificação enzimática em Cadeia (PCR)..... | 19 |
| 1.2. Sequenciação pelo método enzimático de Sanger..... | 20 |
| 1.3. Sequenciação de Nova Geração (NGS) | 21 |
| 1.4. ARN Ribossomal 16S (ARNr 16S) e metagenómica | 27 |
| 1.5. Base de dados do microbioma humano (HOMD)..... | 28 |
| 1.6. Caracterização do Microbioma Oral | 29 |
| 2. Caracterização do microbioma oral em indivíduos de diferentes localizações geográficas..... | 31 |
| IV. Conclusão..... | 71 |
| V. Bibliografia | 73 |

Índice de figuras

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Amplificação enzimática em cadeia de ADN (PCR). A figura mostra a dupla cadeia de ADN inicial, a desnaturação e conseqüente separação das cadeias de ADN, a ligação do primer sintetizado previamente à região de interesse, que possibilitará a ligação da ADN polimerase sintetizará uma cadeia complementar a cada uma das cadeias do ADN inicial. (Adaptado de Green & Sambrook, 2019)..... | 19 |
| Figura 2 - (A) Método Enzimático de Sanger criado em 1977 - processo de síntese de ADN complementar com recurso a dideoxirribonucleótidos modificados. (B) Método Enzimático de Sanger Automatizado em capilares/gel de poliacrilamida, com recurso a fluoróforos..... | 21 |
| Figura 3 - Comparação entre o Método de Sanger e métodos de Sequenciação NGS por síntese. | 23 |
| Figura 4 - Passos da sequenciação por síntese da plataforma Illumina. | 24 |
| Figura 5 - Exemplo de ficheiro FASTQ. A segunda linha representa a sequência gerada. | 25 |
| Figura 6 - Comparação de genoma de referência com a sequência dos fragmentos de ADN obtidos por NGS. | 25 |
| Figura 7 – Classificação taxonómica de bactérias constituintes do microbioma intestinal ao nível da família, com base nos polimorfismos nas regiões hipervariáveis (V1-V9) do ARN 16S. | 27 |
| Figura 8 - Visão geral dos passos do estudo de comunidades microbianas baseados na análise de ARNr 16S e ou de genomas integrais (análise metagenómica). (Adaptado de Deo, P., & Deshmukh, R. 2019). | 27 |
| Figura 9 - Representação da estrutura do ARNr 16S, contendo regiões conservadas e regiões hipervariáveis (V1-V9)..... | 28 |
| Figura 10 - Representação da diferença entre grupos nas diferentes fases de erupção dentária de crianças em relação às mães no estudo de (Mason et al., 2018). Diferença estatisticamente significativa entre a chaveta ($p < 0.05$, Teste de Dunn). (Adaptado de Mason et al., 2018)..... | 36 |
| Figura 11 - O impacto da introdução de alimentos sólidos na dieta das crianças e da erupção dentária nas crianças em estudo por (Sulyanto et al., 2019). As crianças iniciaram, | |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| em média, a dieta com alimentos sólidos aos 6.8 ± 0.9 meses de idade e a erupção dentária ocorreu, em média, aos 8.7 ± 2.2 meses de idade. | 40 |
| Figura 12 - Abundância relativa (%) dos gêneros encontrados na saliva de 5 crianças chinesas no início e 3 semanas após. (Adaptado de Chen et al., 2019). | 46 |
| Figura 13 - Composição do microbioma supragengival e abundâncias dos gêneros em crianças divididas em quatro grupos étnicos (afroamericanos, birmaneses, caucasianos e hispânicos). Capnocytophaga foi o gênero mais abundante no estudo por (Premaraj et al., 2020). | 47 |
| Figura 14 - Espécies em comum e características do microbioma supragengival em cada etnia representadas em Diagrama de Venn, das crianças em estudo em (Premaraj et al., 2020). | 47 |
| Figura 15 - Diferença estatística no microbioma salivar intra e entre grupos saudáveis e doentes e entre gêneros das crianças em estudo em (Li et al., 2021). (Adaptado de Li et al., 2021)..... | 49 |
| Figura 16 - Frequência de presença de 14 espécies no microbioma salivar das crianças divididas em dois grupos: grupo com presença de cárie (doença) e ausência de cárie (saúde) em estudo em (Li et al., 2021). (Adaptado de Li et al., 2021)..... | 50 |
| Figura 17 - Análise da diferença do impacto das variáveis: localização geográfica, gênero e estado de saúde no microbioma salivar através da divergência de Jensen-Shannon das crianças em estudo em (Li et al., 2021). (Adaptado de Li et al., 2021). | 51 |
| Figura 18 - Análise de coordenadas principais da matriz de distância das variáveis: microbioma salivar consoante o estado de saúde (A) e localização geográfica (B) através da divergência de Jensen-Shannon nas crianças em estudo em (Li et al., 2021). (Adaptado de Li et al., 2021). | 52 |
| Figura 19 - Análise da diversidade entre microbiomas salivares de jovens e adultos no estudo de (Burcham et al., 2020)..... | 54 |
| Figura 20 - Abundância de gêneros do microbioma salivar da população jovem e adulta no estudo de (Burcham et al., 2020)..... | 54 |
| Figura 21 - Composição do microbioma (%) dos jovens e adultos no estudo de (Burcham et al., 2020)..... | 55 |
| Figura 22 - Beta diversidade qualitativa entre jovens (A) e adultos (B) do gênero feminino e masculino no estudo de (Burcham et al., 2020)..... | 56 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 23 - Transição da diversidade bacteriana em cada criança (n=8). Os diagramas de caixa representam o número de espécies encontradas consoante a idade. (Adaptado de Kageyama et al., 2019)..... | 57 |
| Figura 24 - Distribuição das espécies dominantes exclusivamente na respetiva faixa etária e as espécies comuns, representada em Diagrama de Venn, na população em estudo por Kageyama et al., em Fukuoka, Japão. A fase exponencial corresponde ao período entre as 10 e as 29 semanas de vida; a fase transitória corresponde ao período entre as 80 e as 120 semanas de vida. As espécies comuns foram prevalentes em todas as fases. A identificação das espécies de acordo com o eHOMD está representada entre parêntesis. (Adaptado de Kageyama et al., 2019)..... | 58 |
| Figura 25 - Etnia da amostra de população estudada em (Tribble et al., 2019)..... | 59 |
| Figura 26 – Distribuição do microbioma encontrado numa amostra de população britânica no estudo de (Bescos et al., 2020)..... | 61 |
| Figura 27 - Abundância relativa das 21 espécies prevalentes de cada indivíduo (n=73) da população adulta de Kyushu, no Japão em estudo por Ihara et al., 2018. A percentagem encontra-se demonstrada por nível de intensidade de cor. A identificação dos taxa no eHOMD encontra-se entre parêntesis à direita do nome da espécie. (Adaptado de Ihara et al., 2019)..... | 62 |
| Figura 28 - Média de abundância relativa (%) de géneros bacterianos presentes nas amostras salivares de 36 indivíduos de Yamaguchi, Japão. (Adaptado de Takeuchi et al., 2018). | 63 |
| Figura 29 - Representação dos taxa em comum entre o grupo afroamericano e euroamericano e as diferenças entre a abundância relativa (%) no estudo de (Yang et al., 2019). | 66 |
| Figura 30 -- Representação dos taxa raros entre o grupo afroamericano e euroamericano e as diferenças entre a abundância relativa (%) no estudo de (Yang et al., 2019)..... | 68 |
| Figura 31 - 21 espécies predominantes no microbioma da língua de 506 idosos estudados por (Asakawa et al., 2018). (Adaptado de Asakawa et al., 2018)..... | 69 |

Índice de tabelas

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Microbioma oral presente nas fases pré-eruptiva, de dentição decídua, mista e permanente da população em estudo por (Mason et al., 2018). | 32 |
| Tabela 2 – Composição do microbioma oral encontrado nas crianças e nas mães estudadas em (Sulyanto et al., 2019). As espécies encontradas em $\geq 75\%$ das crianças/mães estão a sombreado e o número corresponde ao número de indivíduos onde a espécie esteve presente. | 37 |
| Tabela 3 – Espécies bacterianas encontradas em $\geq 90\%$ das crianças australianas entre os 1,9 e 48,6 meses de idade de acordo com o estudo de (Dashper et al., 2019). | 41 |
| Tabela 4 – Microbioma encontrado aos 3, 6, 12, 24 e 178 meses de idade em crianças suecas no estudo de (Dzidic et al., 2018). | 44 |
| Tabela 5 - Géneros com abundâncias diferentes entre jovens e adultos no estudo de (Burcham et al., 2020) ANCOM determinou abundância de género diferencial através da mediana (percentil mediano) e número de contagem da sequência mais elevada encontrada (percentil máximo). F representa a diferença do tamanho de efeito dos géneros entre os dois grupos. | 55 |
| Tabela 6 - Abundância relativa (%) de Bacteroidetes, Actinobacteria e Firmicutes nos grupos euroamericano e afroamericano no estudo de (Yang et al., 2019). | 65 |
| Tabela 7 - Abundância relativa (%) de diferentes taxa nos grupos euroamericano e afroamericano no estudo de (Yang et al., 2019). | 67 |

Lista de siglas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARNr 16S: Ácido ribonucleico ribossomal 16S

ddNTP: Dideoxinucleótido

dNTP: Deoxinucleótido

GRP: Glicoproteína rica em prolina

HOMD: *Human Oral Microbiome Database*

HOT: *Human Oral Taxon*

NGS: *Next Generation Sequencing*

NO: Óxido Nítrico

OMBC: *Oral Microbiome Bank of China*

OTU: *Operational Taxonomic Unit*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

I. Introdução

Os microrganismos estão presentes e afetam todos os aspectos da vida humana. As bactérias, fungos, vírus e protozoários são parte integrante da microbiota oral e auxiliam no combate à invasão e colonização por microrganismos patogênicos. A cavidade oral comunica com o ambiente externo e fatores como a temperatura, pH, hábitos nutricionais têm capacidade de influenciar o microbioma oral (Sharma et al., 2018). O desequilíbrio do microbioma oral pode contribuir para o aparecimento de patologias orais e/ou sistêmicas no ser humano. Os agentes responsáveis pelo estado de doença podem ser de origem exógena ou endógena – através do aumento da concentração de uma determinada população integrante da cavidade oral (Willis et al., 2021).

Métodos dependentes e independentes da cultura dos microrganismos foram aplicados na análise do microbioma oral, revelando que na cavidade oral habitam predominantemente bactérias pertencentes aos Filos *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Neisseria* e *TM7* (Sharma et al., 2018). Os avanços na tecnologia de sequenciação permitem descrever cada vez com mais detalhe e precisão a evolução da composição do microbioma oral desde o nascimento até ao fim da vida, em situações de saúde e de doença e, conseqüentemente, associar determinados microrganismos a patologias orais ou sistêmicas ou à sua prevenção (Caselli et al., 2020).

Algumas doenças associadas à atividade de microrganismos característicos da cavidade oral são doenças sistêmicas cada vez mais presentes na população de países desenvolvidos – patologias cardiovasculares, respiratórias e gastrointestinais - sendo a identificação dos agentes causadores de extrema importância. Tendo em conta que a cavidade oral representa um acesso para o interior do organismo, a composição do microbioma oral afeta a saúde geral de um indivíduo (Belstrøm, 2020; Sharma et al., 2018).

Atualmente, os métodos mais utilizados para caracterizar o microbioma oral recorrem à sequenciação de última geração de fragmentos dos genes que codificam para o ARN ribossomal 16S e à sequenciação de genomas integrais de todos os microrganismos presentes na cavidade oral – metagenômica (Duan et al., 2020).

Estes métodos permitem caracterizar a composição e diversidade dos microrganismos orais a um nível sem precedente, e têm permitido identificar novas espécies e o seu potencial fenotípico (Zhao et al., 2020).

Contudo, a baixa representatividade amostral em termos de etnicidade, geografia e faixa etária, e a complexidade inerente à produção e análise de resultados tem levado a que haja alguma inconsistência nos resultados obtidos por diferentes investigadores. Em consequência, ainda hoje é impossível definir sem ambiguidades um microbioma comensal oral humano, caracterizar adequadamente a diversidade existente ao longo da vida e determinar o impacto de alterações no microbioma comensal na saúde oral.

O objetivo desta revisão narrativa foi caracterizar a evolução do microbioma oral humano e o seu impacto na saúde oral nas diferentes fases da vida, em diferentes grupos étnicos e geografias, tendo por base os mais recentes desenvolvimentos nesta área obtidos com recurso exclusivo a tecnologias de sequenciação de última geração.

II. Materiais e Métodos

A pesquisa para esta revisão narrativa incluiu apenas artigos primários em língua inglesa publicados entre 2018 e 2021, indexados na plataforma *PubMed*, com as seguintes palavras-chave e sua combinação: *oral microbiome in children; oral microbiome in the elderly; evolution of the oral commensal microbiome; oral microbiome and oral health; 16S rRNA; Next Generation Sequencing; NGS*.

Foram incluídos artigos caracterizando o microbioma humano comensal com recurso a metagenômica e/ou sequenciação dos genes codificantes para o ARN ribossomal 16S nas diferentes fases da vida, em diferentes grupos étnicos e geografias.

Foram excluídos artigos de revisão, exceto para contextualização histórica; artigos anteriores a 2018, exceto por razões históricas e artigos sem menção detalhada à composição do microbioma oral comensal.

III. Desenvolvimento

1. Metodologias de amplificação do ADN e de sequenciação

1.1. Amplificação do ADN por Reação de amplificação enzimática em Cadeia (PCR)

O PCR é um método automático que permite amplificar o ADN em dupla cadeia milhões de vezes em pouco mais de uma hora. Foi descoberto por Kary Mullis em 1985. Este método inicia-se com a desnaturação das cadeias de ADN a temperaturas superiores a 90°C. Posteriormente, a temperatura baixa para cerca de 55°C e dois *primers* complementares à região a amplificar ligam-se ao ADN (**Figura 1**). Finalmente, a temperatura sobe para cerca de 70°C e a síntese das cadeias complementares dá-se a partir da extremidade 3' de cada *primer* por ação de uma ADN polimerase termostável (Green & Sambrook, 2019).

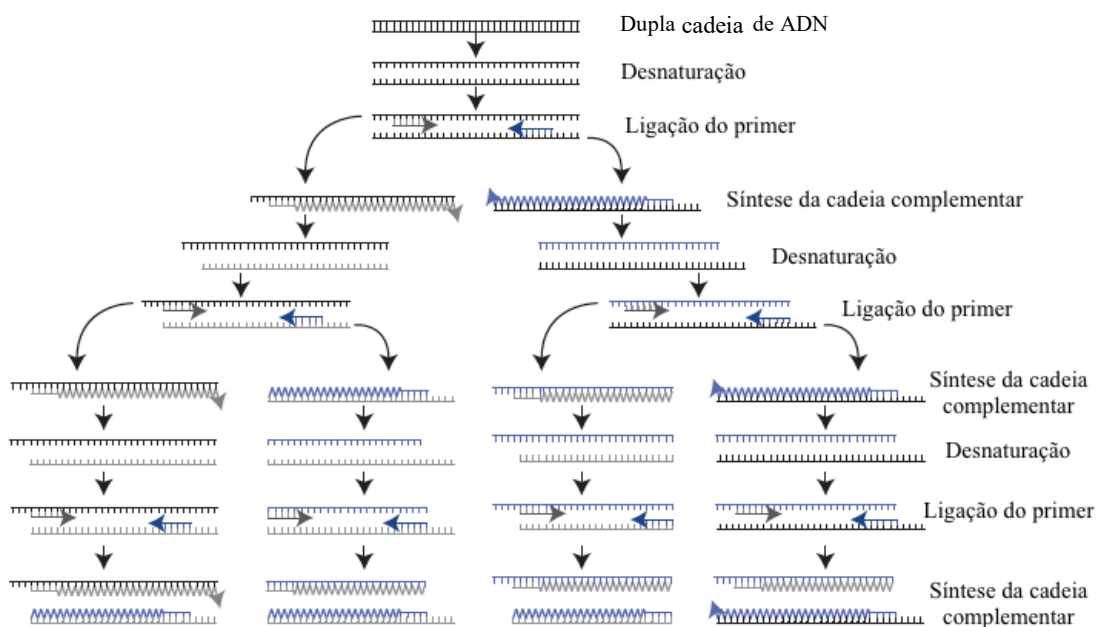


Figura 1 - Amplificação enzimática em cadeia de ADN (PCR). A figura mostra a dupla cadeia de ADN inicial, a desnaturação e consequente separação das cadeias de ADN, a ligação do *primer* sintetizado previamente à região de interesse, que possibilitará a ligação da ADN polimerase sintetizará uma cadeia complementar a cada uma das cadeias do ADN inicial. (Adaptado de Green & Sambrook, 2019).

Por norma, é possível repetir o processo até cerca de 50 vezes, até que algum dos fatores necessários seja limitante para a continuação do processo, tendo como resultado final $> 10^6$ cópias da região alvo do ADN inicial (Green & Sambrook, 2019).

1.2. Sequenciação pelo método enzimático de Sanger

Em 1977, Sanger e colaboradores, tornaram possível a sequenciação de ADN, através do método por eles descoberto, também conhecido como Método de Sanger, que consiste na síntese de uma cadeia complementar a uma cadeia simples de ADN molde através de uma mistura contendo um *primer*, ADN Polimerase, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP) e dideoxirribonucleótidos modificados (ddNTPs: ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) (**Figura 2**). Ao serem adicionados à cadeia em síntese, os desoxirribonucleótidos modificados, impedem a ligação fosfodiéster ao nucleótido seguinte, uma vez que lhes foi previamente retirado o grupo OH na sua extremidade 3', tendo por isso a denominação de nucleótidos de terminação. Os produtos de reação são separados por tamanho através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Assim, é possível obter diversos fragmentos de ADN complementar, repetindo o processo tantas vezes quanto necessário, ordenando-os à posteriori, permitindo-nos saber qual a sequência do ADN molde. Nos anos seguintes, o Método de Sanger, evoluiu com a utilização de ddNTPs marcados com diferentes fluoróforos, que emitem luz de cor diferente após excitação por laser (Crossley et al., 2020; Wang et al., 2019). Esta inovação permitiu ainda fazer eletroforese de todos os produtos de sequenciação num único gel de poliacrilamida presente num capilar, o que permitiu automatizar todo o processo.

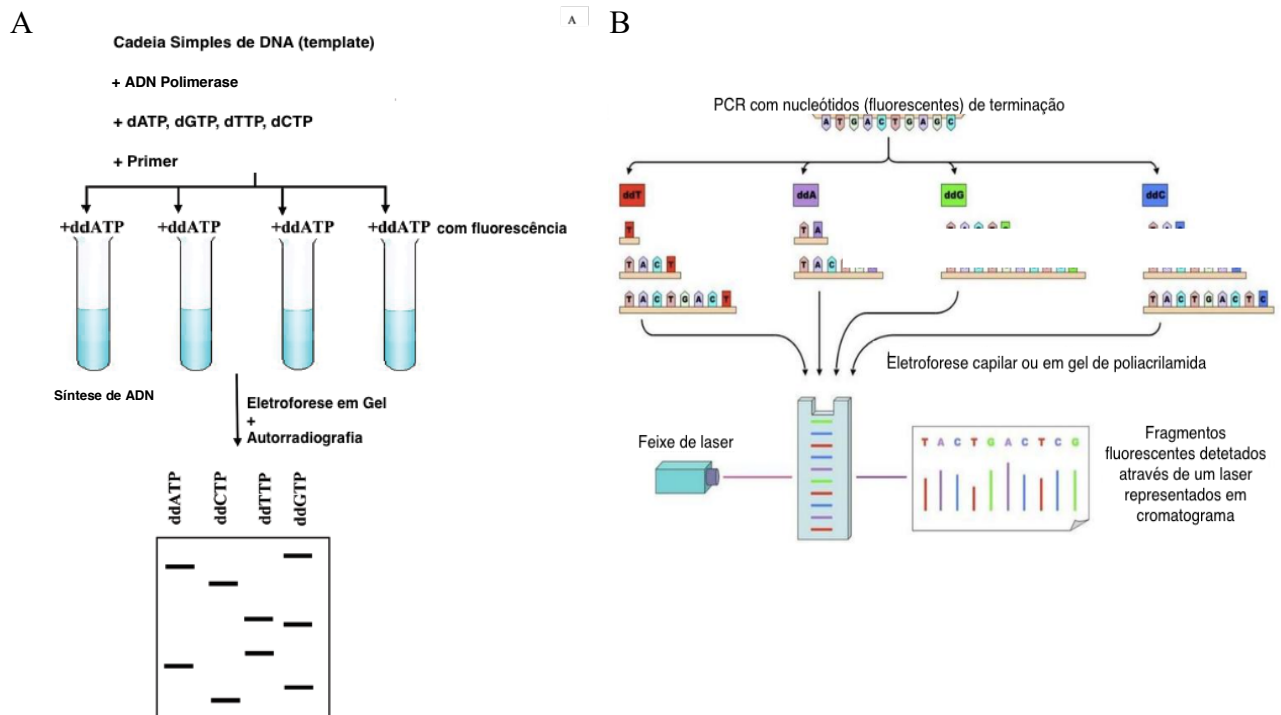


Figura 2 - (A) Método Enzimático de Sanger criado em 1977 - processo de síntese de ADN complementar com recurso a dideoxirribonucleótidos modificados. (B) Método Enzimático de Sanger Automatizado em capilares/gel de poliacrilamida, com recurso a fluoróforos.

1.3. Sequenciação de Nova Geração (NGS)

Não obstante os custos elevados, a elevada complexidade e o tempo de execução e análise relativamente demorado, foi possível sequenciar pela primeira vez o genoma humano na totalidade em 2004 usando a técnica de Sanger (Bruijns et al., 2018).

Mais recentemente, surgiram as técnicas de sequenciação de Nova Geração (NGS), que englobam as técnicas de 2^a e 3^a geração, e que permitem determinar diversas sequências de nucleótidos de um genoma em paralelo e com elevado rendimento (Bruijns et al., 2018).

Em 2006 foram publicados os primeiros métodos de sequenciação de Nova Geração (NGS), revelando capacidade de sequenciar milhões de fragmentos de ADN a elevado

ritmo e a um custo reduzido, comparativamente ao método de Sanger (Bhat & Jain, 2020; Flores-Pérez et al., 2019).

Os métodos de sequenciação NGS têm a capacidade de gerar sequências com cerca de 400 nucleótidos que são concatenadas para formar genes e/ou genomas completos e permitem depois a identificação de bactérias ao nível do filo, género e espécie por análise comparativa e evolutiva com sequências de referência depositadas em bases de dados como o *GenBank* (Sharma et al., 2018).

Independentemente do método de NGS utilizado, é necessário seguir uma série de passos para obter resultados (**Figura 3**) (Flores-Pérez et al., 2019). Em primeiro lugar, o ADN a sequenciar deve ser fragmentado mecanicamente (através de ultrassons, por exemplo) ou com recurso a enzimas com capacidade de quebrar ligações fosfodiéster encontradas entre nucleótidos – endonucleases, isolando as regiões de interesse do ADN inicial (Bhargava & Gupta, 2021). Esses fragmentos são reparados, caso seja necessário, de forma a terem extremidades 3' com grupo hidroxilo e extremidades 5' com grupo fosfato intactas. Estas extremidades vão permitir a ligação de adaptadores específicos dependendo da plataforma de NGS utilizada. Os fragmentos de ADN são unidos aos adaptadores através de uma ligase, que estabelece ligações covalentes entre ambas as partes. Antes da sequenciação dos fragmentos de interesse, é possível que haja necessidade de amplificar os fragmentos, dependendo do tamanho da amostra, permitindo que a sequenciação seja de fácil leitura e impedindo erros na leitura por artefactos.

Há quatro tipos de Sequenciação NGS: Pirosequenciação, Sequenciação por ligação, Sequenciação por Semicondutores de Iões e Sequenciação por Síntese, sendo este último o mais utilizado nos dias de hoje (Bhat & Jain, 2020). Estes métodos permitem sequenciar genomas completos, sequenciar transcriptomas completos ou sequenciar regiões específicas do genoma bacteriano, em geral os genes que codificam para o ARN ribossomal 16S.

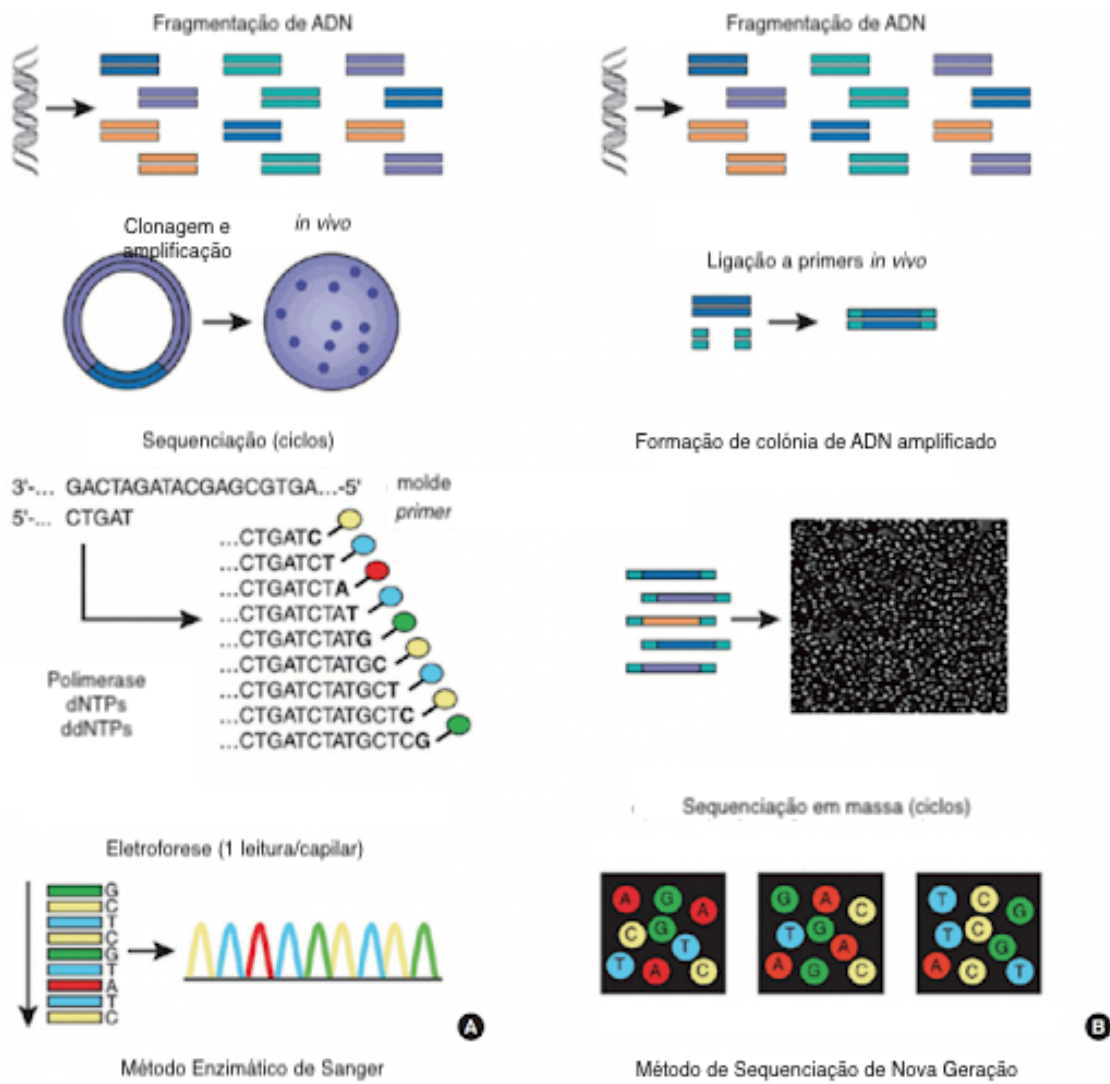


Figura 3 - Comparação entre o Método de Sanger e métodos de Sequenciação NGS por síntese.

Dentro dos métodos de Sequenciação por Síntese, a plataforma mais utilizada nos dias de hoje é a *Illumina* (**Figura 4**), cujo método de sequenciação é semelhante ao descrito acima,

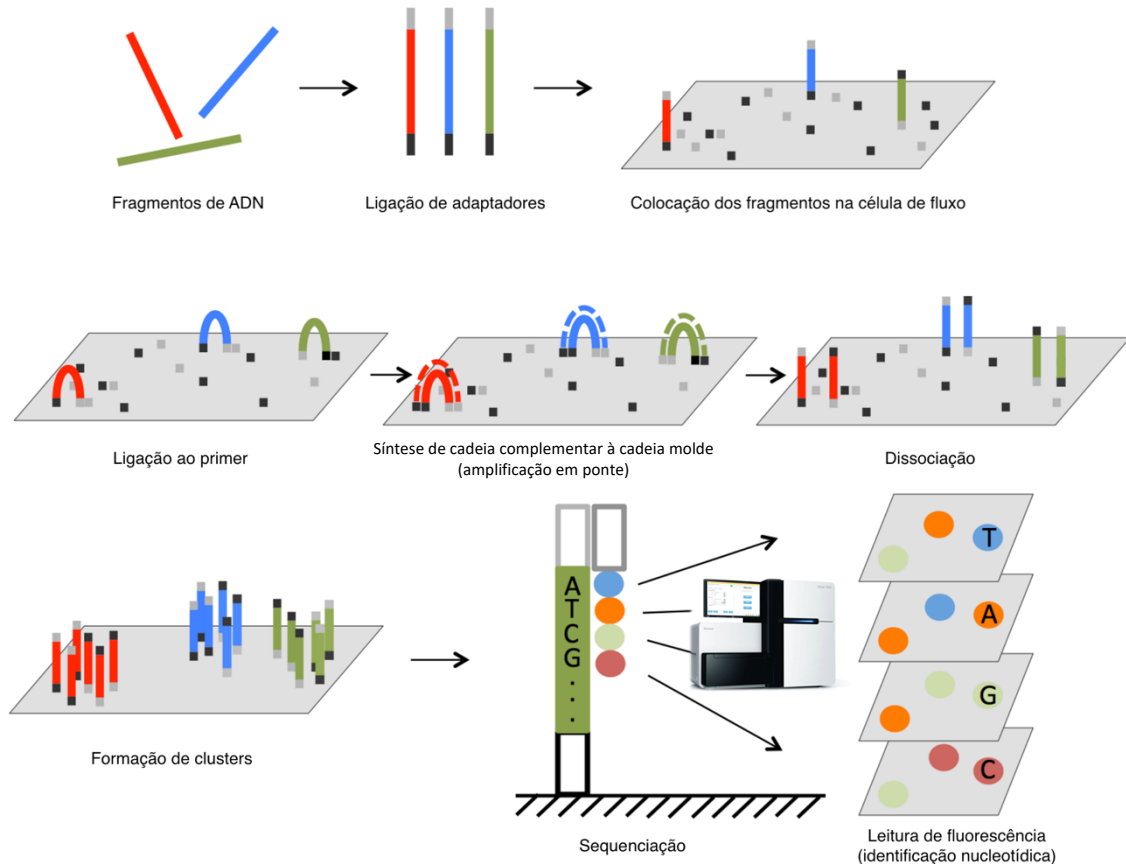


Figura 4 - Passos da sequenciação por síntese da plataforma *Illumina*.

diferindo no recurso a uma célula de fluxo com oito colunas na sua superfície, onde se imobilizam os fragmentos de ADN através da sua ligação a adaptadores (Flores-Pérez et al., 2019). Após a fragmentação do ADN, reparação das extremidades dos fragmentos e ligação dos adaptadores aos moldes de ADN, como referido acima, é iniciada amplificação em ponte, onde os fragmentos formam um arco e se ligam às sequências de oligonucleótidos complementares à extremidade livre (Slatko et al., 2018). Cada molde de ADN gera milhares de cópias (*clusters*) e, conseqüentemente, milhões de *clusters* dos diferentes moldes. De seguida, é adicionada ADN polimerase e ddNTPs marcados com fluoróforos que emitem luz de quatro cores diferentes, terminando a polimerização aquando da ligação do ddNTP marcado com fluorescência. O ddNTP é clivado enzimaticamente, permitindo a incorporação do nucleotídeo seguinte.

Após a sequenciação, é necessário garantir que se obteve quantidade de ADN suficiente e de qualidade – sem erros aquando da leitura, que ocorrem em casos de grande quantidade de ADN, provocando saturação da célula de fluxo (Ji & Sadreyev, 2018). Para evitar este erro, é necessário analisar a quantidade de ADN antes de o sequenciar. Por norma, as leituras são armazenadas em ficheiros FASTQ. A plataforma captura o sinal luminoso e converte-o em texto (A,C,T,G) – *Base Calling* (**Figura 5**) (Flores-Pérez et al., 2019).

```

1 @ERR000589.41 EAS139_45:5:1:2:111/1
2 CTTTCCTCCCTGCTTTCCTGGCCCCACCATTTCCAGGGAACATCTTGTCAT
3 +
4 3IIIIIIIIIIII>1IIIFF9BG08E00I%IG+&?(4)%00646.C1#&(
5 @ERR000589.42 EAS139_45:5:1:2:1293/1
6 AGTTGTTAAATCCAAGCCAATTAAGATAGTCTTATCTTTTTAAAGAAAT
7 +
8 IIIIIIGII.AI IIII=?I9G-/II=+I=4?761BA2C9I+5A711+&>1$/I

```

Figura 5 - Exemplo de ficheiro FASTQ. A segunda linha representa a sequência gerada.

A qualidade da sequenciação pode ser avaliada através da verificação da distribuição de A,C,T,G, sendo que a quantidade de A e T excede a de C e G, por norma (Ji & Sadreyev, 2018). É também possível verificar a possibilidade de erro de leitura, através de “ $-10 \times \log_{10}(p)$,” onde “p” representa a probabilidade de erro. A plataforma *Illumina* sugere os seguintes programas de análise de dados: *Local Run Manager*, *BaseSpace Sequence Hub*, *DRAGEN BioIT Platform*, *NextSeq 1000/2000 On Board DRAGEN*.

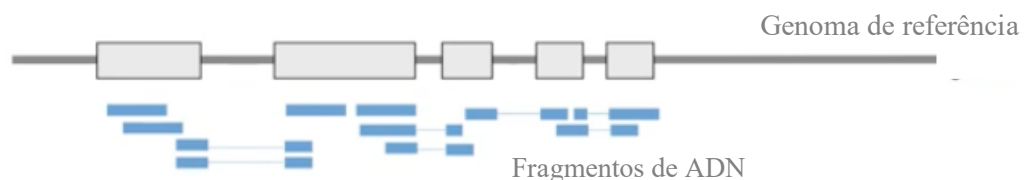


Figura 6 - Comparação de genoma de referência com a sequência dos fragmentos de ADN obtidos por NGS.

Segue-se o alinhamento das sequências obtidas dos diferentes fragmentos de ADN, que é também um processo informatizado, e permite comparar diversas leituras do mesmo

fragmento, verificar se há erros ou polimorfismos, através da comparação com genomas de referência (**Figura 6**) (Ji & Sadreyev, 2018). Existem diversos algoritmos de alinhamento, como o *Burrows-Wheeler Alignment (BWA)*, amplamente usado nos dias de hoje, que cria ficheiros em formato de mapas de alinhamento de sequências (*Sequence Alignment/Map – SAM*) (Flores-Pérez et al., 2019). Este ficheiro é posteriormente convertido num ficheiro binário (BAM), por ser mais adequado para os passos que se seguem.

GATK, *SAMTools* e VCMM são as principais plataformas desenhadas para identificar polimorfismos num único nucleótido (*Single Nucleotide Variants – SNVs*) (Flores-Pérez et al., 2019). Apesar das três plataformas identificarem polimorfismos em comum, cada plataforma tem as suas limitações, no sentido em que consegue também identificar polimorfismos que as restantes não identificam.

No caso de haver mutações de inserção/deleção (*indel mutations*) de nucleótidos, são utilizados algoritmos específicos, por ser um processo mais complexo, sendo os métodos mais utilizados *gapped alignment* (GATK, *SAMtools*) e *split reads* (Pindel) (Flores-Pérez et al., 2019). No entanto, nenhum destes métodos se adequa no caso da mutação *indel* envolver um grande número de nucleótidos.

Existem também plataformas online (ANNOVAR, *AnnTools*, SVA, VARIANT, VEP), que registam os polimorfismos encontrados e os distinguem de possíveis artefactos ou erros de leitura, evidenciando os polimorfismos com valor clínico (Flores-Pérez et al., 2019). Fornecem informação sobre a mutação, dando ainda acesso a bases de dados de todas as mutações conhecidas até ao momento.

No que toca à identificação da espécie, os programas utilizados no alinhamento das sequências têm uma ferramenta que calcula o nível de semelhança (*Likelihood function*) entre as diversas sequências encontradas, comparando-as entre elas e com as bases de dados de genomas disponíveis (Whelan & Morrison, 2017). É possível agrupar sequências se houver um determinado nível de semelhança de sequências de ADN num determinado gene, permitindo-nos inferir que microrganismos que partilhem elevado grau de semelhança, serão taxonomicamente próximos – Unidades Taxonómicas

Operacionais (UTOs) – possibilitando a construção de uma árvore filogenética (**Figura 7**) (Layeghifard et al., 2018; Porter & Hajibabaei, 2018).

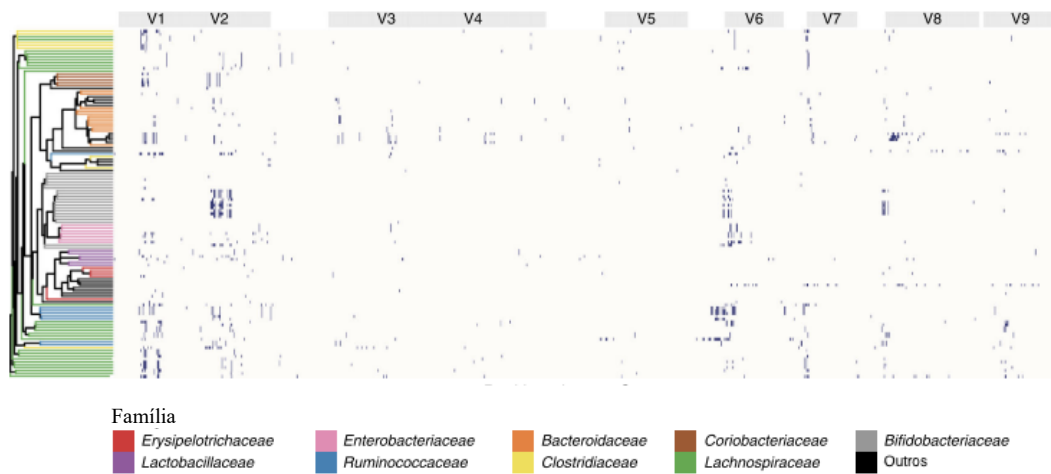


Figura 7 – Classificação taxonômica de bactérias constituintes do microbioma intestinal ao nível da família, com base nos polimorfismos nas regiões hipervariáveis (V1-V9) do ARN 16S.

1.4. ARN Ribossomal 16S (ARNr 16S) e metagenômica

A identificação de microrganismos pode ser realizada através da análise de sequências dos genes que codificam para o ARN ribossomal 16S ou através da sequenciação dos seus genomas (metagenômica). A sequenciação do ARN ribossomal 16S permite-nos determinar a presença e abundância de espécies, enquanto que a metagenômica revela as vias metabólicas para além de confirmar a presença e abundância de cada gene de cada microrganismo presente numa amostra (**Figura 8**).

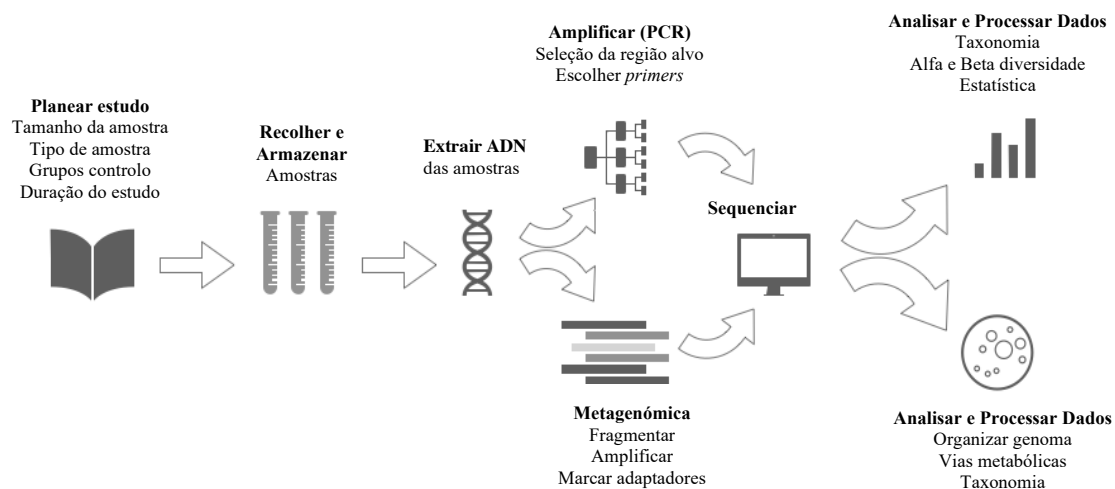


Figura 8 - Visão geral dos passos do estudo de comunidades microbianas baseados na análise de ARNr 16S e de genomas integrais (análise metagenômica). (Adaptado de Deo, P., & Deshmukh, R. 2019).

O gene do ARNr 16S ou ADN 16S codifica para o ARNr 16S que está presente na subunidade 30S ribossomal de todos os procariontes (*Bacteria* e *Archaea*) e é utilizado como marcador genético por ter regiões altamente conservadas e inalteradas ao longo da evolução, previamente sequenciadas em muitos microrganismos. No entanto, possui também 9 regiões hipervariáveis (entre grupos taxonómicos), sendo denominadas V1-V9 (**Figura 9**). Através da sequenciação destas regiões, é possível classificar microrganismos taxonomicamente pertencentes aos domínios *Bacteria* e *Archaea* até ao nível da espécie (Deo & Deshmukh, 2019; Flores-Pérez et al., 2019; Johnson et al., 2019).

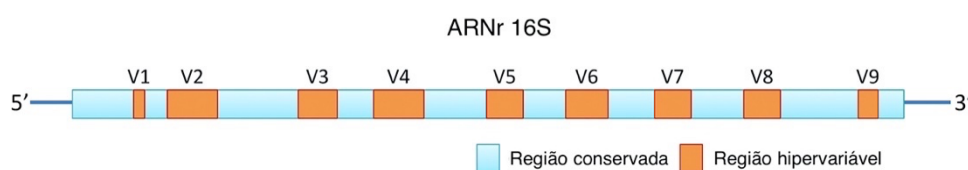


Figura 9 - Representação da estrutura do ARNr 16S, contendo regiões conservadas e regiões hipervariáveis (V1-V9).

As zonas conservadas do ARNr 16S são utilizadas para confeccionar *primers* universais aquando da amplificação das zonas alvo na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), permitindo a posterior sequenciação tanto das zonas conservadas como das zonas hipervariáveis (Fuks et al., 2018).

1.5. Base de dados do microbioma oral humano (HOMD)

Graças à evolução dos métodos de sequenciação passou a ser possível identificar microrganismos incultiváveis e, conseqüentemente, inidentificáveis, e foi possível criar um repositório de sequências genómicas bacterianas, incluindo todas as espécies bacterianas conhecidas até à data. A Base de Dados do Microbioma oral Humano (*eHOMD*, <http://www.homd.org/>) foi lançada em 2010 pelo *National Institute of Dental and Craniofacial Research* e possui ferramentas online que permitem identificar e caracterizar as bactérias orais (Sharma et al., 2018).

A base de dados eHOMD possui uma ferramenta com um esquema referência de nomenclatura, que permite nomear provisoriamente *taxa* desconhecidos, através de associações filogenéticas com base nas sequências do ARNr 16S. O eHOMD associa sequências a fenótipos, filogenética e informação clínica e bibliográfica. Um total de 2074 genomas orais/nasais, equivalente a 529 *taxa* (67% da totalidade dos *taxa* e 95% de *taxa* cultiváveis) está disponível no eHOMD acompanhado de notas acessíveis através de *softwares* de pesquisa de genomas. A informação recolhida pelo eHOMD é de simples acesso e contém ferramentas de visualização, disponibilizando a totalidade dos genomas bacterianos publicados (Escapa et al., 2018).

1.6. Caracterização do Microbioma Oral

A capacidade de identificar microrganismos não é suficiente para caracterizar um biofilme e, conseqüentemente, o microbioma oral (Sharma et al., 2018). É necessário relacionar e criar redes metabólicas entre microrganismos e entender como se comportam e como dependem uns dos outros, seja na fixação/colonização inicial ou no acesso a nutrientes. Neste sentido é difícil avaliar a patogenicidade de um microrganismo em particular sem um estudo prévio do seu habitat e das relações e funções no seu ecossistema.

As bactérias têm a capacidade de aderir a superfícies através de adesinas, que constituem complexos proteicos com capacidade de se ligar a recetores dos tecidos do hospedeiro formando uma matriz extracelular polissacarídica que serve de reservatório nutricional e permite a adesão de outros microrganismos (Timmermans et al., 2018). Assim, na cavidade oral as bactérias que integram a placa dentária e outros biofilmes formados na língua, na mucosa oral e no espaço subgingival estão direta e indiretamente dependentes umas das outras, criando uma relação simbiótica entre si, formando uma comunidade com interações e trocas metabólicas benéficas e competitivas. Estes biofilmes formados por espécies comensais mantêm a homeostase microbiana da cavidade oral, protegendo-a e prevenindo a colonização por bactérias patogénicas e o subsequente desenvolvimento de doença (Deo, P., & Deshmukh, R. 2019).

Numa fase embrionária, considera-se que a cavidade oral é um ambiente estéril. No entanto, há estudos que referem que o líquido amniótico tem, em 70% de gestantes, microrganismos característicos da cavidade oral (Deo, P., & Deshmukh, R. 2019). Durante o parto natural, o recém-nascido tem o primeiro contacto com microflora uterina e vaginal.

Após o nascimento, através da amamentação, a cavidade oral é inoculada regularmente e dá-se início à formação do microbioma oral (Deo, P., & Deshmukh, R. 2019). Os primeiros colonizadores são microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos na sua maioria: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Neisseria* e *Veillonella*. Assim que se inicia a erupção das peças dentárias, mais microrganismos virão colonizar as novas superfícies em boca, dando-se o início da acumulação de placa bacteriana. Em idosos, com a perda de peças dentárias, é descrito um retrocesso na diversidade bacteriana do microbioma oral, voltando a ser semelhante ao microbioma de uma criança em fase pré-eruptiva.

Os estudos seguintes detalham a constituição do microbioma oral em diferentes países, populações e faixas etárias. Todos os estudos recorreram à sequenciação NGS para caracterizar o microbioma e foram efetuados nos últimos 3 anos.

2. Caracterização do microbioma oral em indivíduos de diferentes localizações geográficas

Em 2018, Mason e colaboradores, analisaram o microbioma oral subgengival de 263 indivíduos originários de Ohio, Estados Unidos da América, com idades que variaram entre o primeiro dia de vida e a idade adulta, tendo todos eles ausência de patologias sistêmicas e de cáries dentárias (Mason et al., 2018). Cento e vinte indivíduos eram pares mãe-filho cujo microbioma oral foi comparado. Para identificação dos microrganismos, as sequências do ARN ribossomal 16S foram sequenciadas através do método NGS pirosequenciação e comparadas à sequências da Base de Dados do Microbioma Oral Humano (HOMD – *Human Oral Microbiome Database*) (Mason et al., 2018).

Nas 47 crianças em fase pré-eruptiva, analisou-se o microbioma da mucosa e as espécies comuns a todos pertencem aos géneros *Streptococcus*, *Gemella*, *Granulicatella* e *Veillonella* (Mason et al., 2018). A comparação do microbioma de 11 crianças em fase pré-eruptiva com o microbioma das respetivas mães, permitiu verificar que, em média, 85% das espécies eram partilhadas entre eles (Mason et al., 2018).

O microbioma salivar comum aos diferentes estágios da dentição humana foi *Streptococcus perioris*, *Streptococcus HOT.064*, *Streptococcus oligofermentans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Veillonella parvula*, *Veillonella atypica*, *Gemella haemolysans*, *Granulicatella adiacens*, *Streptococcus infantis*, *Streptococcus HOT.071*, *Streptococcus HOT.487*, *Gemella morbilorum*, *Streptococcus HOT.058*, *Veillonella dispar*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus HOT.486*, *Streptococcus HOT.431*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus cristatus* e *Gemella sanguinis* (**Tabela 1**) (Mason et al., 2018).

O período entre os 6 meses e os 6 anos de idade, denomina-se período de dentição decídua, em que 20 peças dentárias decíduas erupcionam, iniciando no maxilar inferior, sendo esperado que erupcione uma peça dentária por cada mês (Reddy et al., 2019).

Segue-se o período de dentição mista, correspondente às idades compreendidas entre os 6 e os 13 anos. A partir dos 13 anos, estarão em boca, apenas peças dentárias permanentes. Estes intervalos temporais podem variar de acordo com fatores de crescimento, etnia, nutrição, género, fatores hereditários e hormonais (Chaitanya et al., 2018; Khan et al., 2020).

Na fase correspondente à dentição decídua, verificou-se maior diversidade bacteriana comparativamente à fase pré-eruptiva (Mason et al., 2018). Esta integração de novos membros na comunidade bacteriana, poderá estar relacionada com a capacidade das novas espécies de aderir à superfície dentária. Para além disso, também se verificou aumento da complexidade estrutural da comunidade, permitindo a adesão de novas espécies pertencentes aos géneros *Streptococcus*, *Gemella*, *Granulicatella* e *Veillonella*.

Tabela 1 - Microbioma oral presente nas fases pré-eruptiva, de dentição decídua, mista e permanente da população em estudo por (Mason et al., 2018).

| Taxa \ Dentição | Pré-eruptiva (n=47) (até aos 6 meses de idade em média) | Decídua (n=59) (dos 6 meses aos 6 anos de idade) | Mista (n=47) (6 anos – 13 anos) | Permanente (n=50) (>13 anos) |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| <i>Streptococcus perioris</i> | | | | |
| <i>Streptococcus HOT.064</i> | | | | |
| <i>Streptococcus oligofementans</i> | | | | |
| <i>Streptococcus mitis</i> | | | | |
| <i>Streptococcus oralis</i> | | | | |
| <i>Streptococcus parasanguinis</i> | | | | |
| <i>Streptococcus australis</i> | | | | |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | | | | |
| <i>Veillonella parvula</i> | | | | |
| <i>Veillonella atypica</i> | | | | |

| | | | | |
|-----------------------------------|--|--|--|--|
| <i>Gemella haemolysans</i> | | | | |
| <i>Granulicatella adiacens</i> | | | | |
| <i>Streptococcus infantis</i> | | | | |
| <i>Streptococcus HOT.071</i> | | | | |
| <i>Streptococcus HOT.487</i> | | | | |
| <i>Gemella morbilorum</i> | | | | |
| <i>Streptococcus HOT.058</i> | | | | |
| <i>Veillonella díspar</i> | | | | |
| <i>Streptococcus sobrinus</i> | | | | |
| <i>Streptococcus HOT.486</i> | | | | |
| <i>Streptococcus HOT.431</i> | | | | |
| <i>Streptococcus sanguinis</i> | | | | |
| <i>Streptococcus cristatus</i> | | | | |
| <i>Gemella sanguinis</i> | | | | |
| <i>Streptococcus HOT.074</i> | | | | |
| <i>Streptococcus salivarius</i> | | | | |
| <i>Streptococcus HOT.065</i> | | | | |
| <i>Streptococcus intermedius</i> | | | | |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | | | | |
| <i>Streptococcus vestibularis</i> | | | | |
| <i>Veillonella HOT.780</i> | | | | |
| <i>Streptococcus HOT.057</i> | | | | |
| <i>Veillonella denticariosi</i> | | | | |
| <i>Lautropia mirabilis</i> | | | | |
| <i>Neisseria sicca</i> | | | | |

Evolução do microbioma oral humano e o seu impacto na saúde oral

| | | | | |
|-----------------------------------|--|--|--|--|
| <i>Rothia dentocariosa</i> | | | | |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | | | | |
| <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | | | | |
| <i>Terrahaemophilus</i> | | | | |
| <i>Neisseria HOT.499</i> | | | | |
| <i>Neisseria weaveri</i> | | | | |
| <i>Streptococcus HOT.066</i> | | | | |
| <i>Rothia aerea</i> | | | | |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | | | | |
| <i>Abiotrophia defectiva</i> | | | | |
| <i>Leptotrichia hongkongensis</i> | | | | |
| <i>Neisseria elongata</i> | | | | |
| <i>Porphyromonas HOT.279</i> | | | | |
| <i>Capnocytophaga sputigena</i> | | | | |
| <i>Kingella oralis</i> | | | | |
| <i>Capnocytophaga gingivalis</i> | | | | |
| <i>Haemophilus haemolyticus</i> | | | | |
| <i>Granullicatella elegans</i> | | | | |
| <i>Kingella denitrificans</i> | | | | |
| <i>Neisseria subflava</i> | | | | |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | | | | |
| <i>Actinomyces HOT.180</i> | | | | |
| <i>Rothia mucilaginosa</i> | | | | |
| <i>Streptococcus HOT.061</i> | | | | |
| <i>Leptotrichia HOT.212</i> | | | | |

| | | | | |
|------------------------------------|--|--|--|--|
| <i>Streptococcus</i> HOT.069 | | | | |
| <i>Corynebacterium matruchotti</i> | | | | |
| <i>Actinomyces</i> HOT.171 | | | | |
| <i>Streptococcus gordonii</i> | | | | |
| <i>Leptotrichia buccalis</i> | | | | |
| <i>Veillonella rogosae</i> | | | | |
| <i>Capnocytophaga leadbetteri</i> | | | | |
| <i>Streptococcus downei</i> | | | | |
| <i>Lachnoanaerobaculum</i> | | | | |
| <i>Streptococcus</i> HOT.070 | | | | |
| <i>Leptotrichia</i> HOT.225 | | | | |
| <i>Actinomyces</i> HOT.172 | | | | |
| <i>Haemophilus</i> HOT.035 | | | | |
| <i>Neisseria flava</i> | | | | |
| <i>Eikenella corrodens</i> | | | | |
| <i>Streptococcus</i> HOT.056 | | | | |
| <i>Fusobacterium periodonticum</i> | | | | |
| <i>Aggregatibacter</i> HOT.513 | | | | |
| <i>Actinomyces naeslundii</i> | | | | |
| <i>Corynebacterium durum</i> | | | | |

(Adaptado de Mason et al., 2018)

Aquando da erupção dentária, a semelhança do microbioma entre mãe e filho diminuiu, e essa divergência manteve-se ao longo das fases dentadas (**Figura 10**) (Mason et al., 2018). Apesar de se saber que o microbioma é influenciado pelo genótipo do hospedeiro, por fatores ambientais e pela transmissão vertical, a formação do microbioma ainda não é considerada um processo previsível relativamente às espécies que o vão constituir. Neste estudo, o microbioma não se alterou com base na diferença da alimentação entre

crianças e adultos, mas sim consoante as alterações no habitat. Essa personalização individual é limitada, na medida em que o microbioma primordial, traça o caminho das novas comunidades que se juntarão ao microbioma já existente. Através da aplicação de métodos de previsão estatística, não foram encontradas diferenças significativas relativamente à função das estirpes presentes, indicando que, apesar de haver diferenças inter-indivíduo, essa heterogeneidade taxonómica será congruente a nível de função, procurando responder às necessidades do ecossistema (Mason et al., 2018).

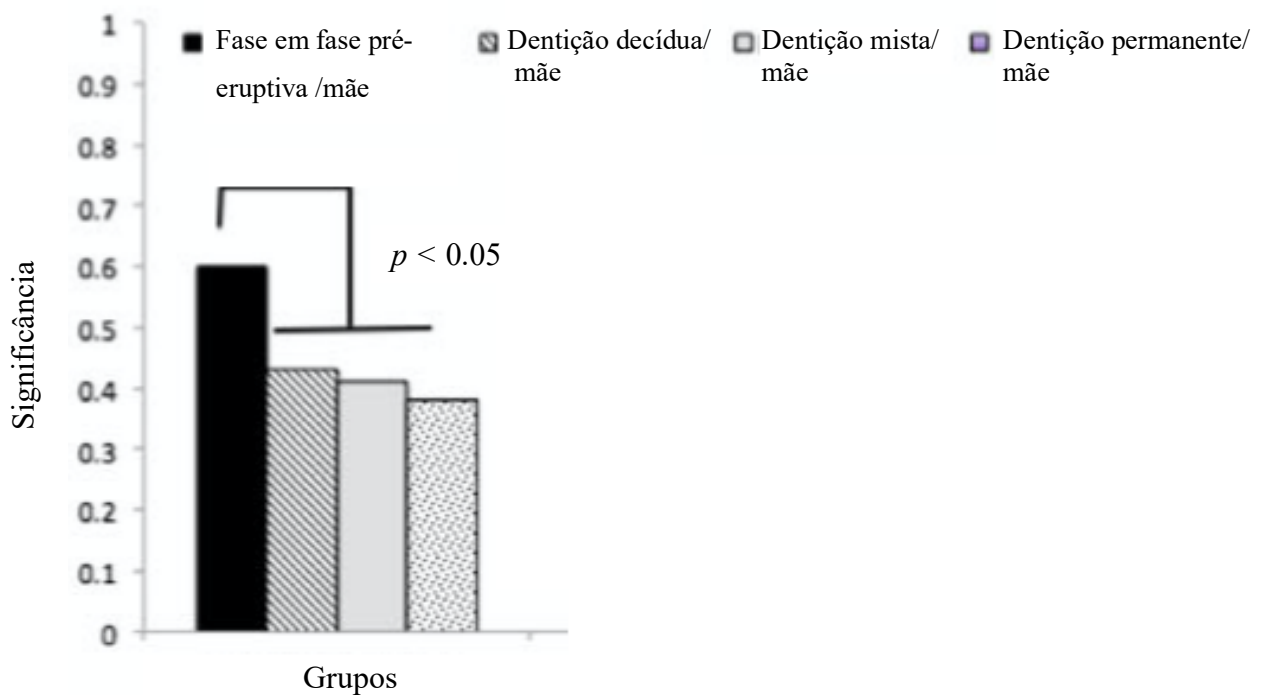


Figura 10 - Representação da diferença entre grupos nas diferentes fases de erupção dentária de crianças em relação às mães no estudo de (Mason et al., 2018). Diferença estatisticamente significativa entre a chaveta ($p < 0.05$, Teste de Dunn). (Adaptado de Mason et al., 2018)

Sulyanto e colaboradores, analisaram as espécies presentes no microbioma oral salivar (**Tabela 2**), através da sequenciação das regiões V1 a V3 do ARN ribossomal 16S usando a tecnologia NGS *Roche 454 GS FLX*, ao longo do primeiro ano de vida de 9 crianças (6 raparigas e 3 rapazes) de diferentes etnias, residentes em Ohio, Estados Unidos da América, desde o dia do seu nascimento. As amostras de saliva das crianças foram recolhidas mensalmente. Foram também recolhidas amostras de saliva das suas mães (9), apenas num momento, que correspondeu à primeira recolha de amostras das crianças (**Tabela 2**) (Sulyanto et al., 2019).

Em relação à etnia, as 8 crianças para as quais foi obtida informação estavam assim divididas: 3 afroamericanas, 3 caucasianas e 2 asiáticas. Relativamente à alimentação, 3 crianças foram amamentadas, 5 foram amamentadas e também consumiram leite de fórmula e 1 das crianças apenas ingeriu leite de fórmula (Sulyanto et al., 2019).

A composição do microbioma oral presente em $\geq 75\%$ das crianças dos 0-2 meses, 7-9 meses, 10-12 meses de idade e das respetivas mães, está indicada na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Composição do microbioma oral encontrado nas crianças e nas mães estudadas em (Sulyanto et al., 2019). As espécies encontradas em $\geq 75\%$ das crianças/mães estão a sombreado e o número corresponde ao número de indivíduos onde a espécie esteve presente.

| Taxa (espécie) | Idade (meses) | | | |
|---------------------------------------|---------------|-----|-------|----------------|
| | 0-2 | 7-9 | 10-12 | Adultos (Mães) |
| <i>Streptococcus mitis</i> group | 8 | 8 | 8 | 8 |
| <i>Streptococcus salivarius</i> group | 8 | 8 | 8 | 8 |
| <i>Gemella haemolysans</i> | 8 | 7 | 8 | 8 |
| <i>Veillonella parvula</i> group | 7 | 8 | 8 | 8 |
| <i>Rothia mucilaginosa</i> | 6 | 8 | 8 | 8 |
| <i>Veillonella</i> HB016 | 6 | 7 | 7 | 5 |
| <i>Prevotella melaninogenica</i> | 5 | 6 | 7 | 8 |
| <i>Streptococcus parasanguinis</i> | 4 | 8 | 8 | 8 |

| | | | | |
|-------------------------------------|---|---|---|---|
| <i>Granulicatella elegans</i> | 4 | 7 | 7 | 5 |
| <i>Granulicatella adiacens</i> | 5 | 6 | 8 | 8 |
| <i>Streptococcus peroris</i> | 3 | 6 | 6 | 1 |
| <i>Alloprevotella</i> IK062 | 3 | 6 | 6 | 3 |
| <i>Neisseria flavescens</i> | 2 | 6 | 6 | 6 |
| <i>Leptotrichia</i> Arg j44 | 0 | 6 | 3 | 0 |
| <i>Porphyromonas</i> HF001 | 1 | 5 | 7 | 2 |
| <i>Streptococcus cristatus</i> | 3 | 5 | 6 | 4 |
| <i>Neisseria meningitidis</i> group | 1 | 5 | 6 | 5 |
| <i>Leptotrichia</i> FO036 | 1 | 3 | 6 | 2 |

(Adaptado de Sulyanto et al., 2019)

Neste estudo longitudinal, as espécies exógenas (provavelmente provenientes da pele e do ambiente envolvente) presentes inicialmente nas crianças (pertencentes ao género *Staphylococcus*), foram rapidamente substituídas por uma comunidade comum a todas as crianças e adultos (Sulyanto et al., 2019). Observou-se o aumento gradual da complexidade do microbioma. Ao atingir o primeiro ano de idade o microbioma evoluiu no sentido do microbioma adulto. Relativamente à abundância relativa das espécies, em todas as idades foi detetado um conjunto de espécies em comum, indicando que a estrutura dominante da comunidade do microbioma oral se estabelece nos primeiros estádios de vida e que se mantém ao longo da vida.

As proteínas de adesão da espécie *Streptococcus mitis*, têm capacidade de se ligar à amilase salivar (Sulyanto et al., 2019). Para além disso, membros do *Streptococcus mitis* group, possuem proteínas ricas em serina na sua superfície com capacidade de se ligar a outras bactérias, células e fibronectina. A adesão bactéria-bactéria já foi demonstrada e é provável que tenha influência na ordem de integração de bactérias num microbioma.

Foi observada a agregação em biofilme das primeiras espécies presentes no microbioma das crianças (pertencentes aos géneros *Streptococcus*, *Veillonella* e *Rothia*). Esse

mecanismo pode estar dependente de fatores como as estruturas densas *meshwork-like* presentes na superfície da *Rothia mucilaginosa* e presença de Hag1 (adesina) na *Veillonella atypica*, que tem capacidade de mediar ligações entre células epiteliais orais e outras bactérias. Para além disso, outros mecanismos como a dependência de nutrientes, fatores imunitários do hospedeiro e diferentes estratégias metabólicas das bactérias, podem influenciar a construção do microbioma (Sulyanto et al., 2019).

Neste estudo, foi referenciado um estudo por Zhou et al., onde se verificou que *Streptococcus mitis* e *Streptococcus oralis* proliferam com facilidade na saliva, correlacionando-se esse facto à capacidade de hidrolisar açúcares provenientes das glicoproteínas ricas em prolina da saliva (GRP). Já *Gemella haemolysans* e *Granulicatella elegans* proliferaram a um nível intermédio, e nas espécies tardias como *Streptococcus parasanguinis* e *Granulicatella adiacens* não se verificou capacidade de proliferar. As espécies referidas anteriormente não tiveram capacidade de hidrolisar GRPs, sugerindo que as primeiras espécies a habitar a cavidade oral, pela sua capacidade de hidrolisar GRPs, fornecem nutrientes às espécies tardias, podendo esta ser uma das explicações para a ordem cronológica com que aumenta a complexidade do microbioma oral na criança (Sulyanto et al., 2019).

Apesar de haver estudos que associam o aumento da complexidade do microbioma à erupção das primeiras peças dentárias e não à introdução de alimentos sólidos na dieta das crianças, neste estudo, pelo contrário, verificaram-se alterações do microbioma associados à introdução de alimentos sólidos, não se verificando diferença significativa aquando da erupção dentária (**Figura 11**) (Sulyanto et al., 2019).

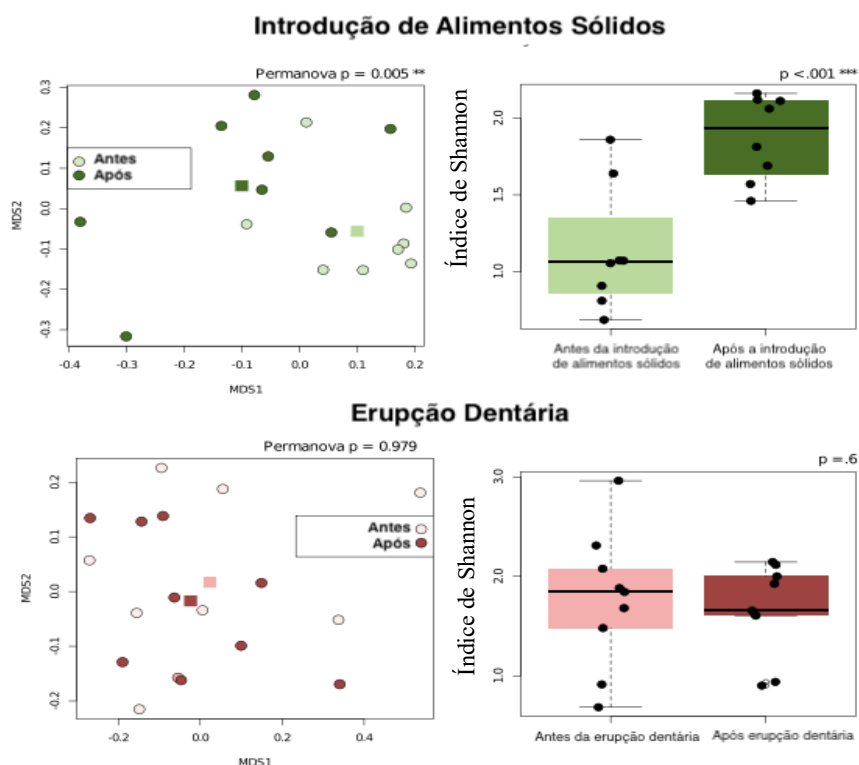


Figura 11 - O impacto da introdução de alimentos sólidos na dieta das crianças e da erupção dentária nas crianças em estudo por (Sulyanto et al., 2019). As crianças iniciaram, em média, a dieta com alimentos sólidos aos 6.8 ± 0.9 meses de idade e a erupção dentária ocorreu, em média, aos 8.7 ± 2.2 meses de idade.

Apesar da erupção dentária representar novas superfícies para novas espécies aderirem, a introdução de novos substratos também pode ser uma fator igualmente, se não mais, importante (Sulyanto et al., 2019). Tendo em conta que a introdução de alimentos sólidos coincide com a erupção das primeiras peças dentárias, mais estudos são necessários para poder chegar a uma conclusão relativamente ao fator que terá mais impacto no microbioma oral da criança.

Um estudo feito em Vitória, na Austrália, no ano de 2019 por Dashper e colaboradores, analisou longitudinalmente o microbioma salivar de 134 crianças da mesma idade, em seis momentos diferentes (entre os 1,9 e 48,6 meses). Foi recolhida saliva não estimulada e, posteriormente, a sua análise foi realizada recorrendo à sequenciação NGS *Ion Torrent Personal Genome Machine* da região V4 do ARN ribossomal 16S (Dashper et al., 2019).

A diversidade bacteriana aumentou com a idade, estabilizando aos 39 meses. Foi possível inferir a existência de um microbioma comum baseado nas espécies presentes em mais de 90% da amostra em cada idade. As espécies bacterianas presentes na saliva em mais de 90% das crianças nos primeiros meses de vida, estão representadas na **Tabela 3** (Dashper et al., 2019).

Tabela 3 – Espécies bacterianas encontradas em $\geq 90\%$ das crianças australianas entre os 1,9 e 48,6 meses de idade de acordo com o estudo de (Dashper et al., 2019).

| Idade (meses) | 1,9 | 7,7 | 13,2 | 19,7 | 39,0 | 48,6 |
|------------------------------------------|-----|-----|------|------|------|------|
| Taxa | | | | | | |
| <i>Streptococcus mitis group</i> | | | | | | |
| <i>Gemella haemolysans</i> | | | | | | |
| <i>Streptococcus salivarius group</i> | | | | | | |
| <i>Rothia mucilaginosa</i> | | | | | | |
| <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | | | | | | |
| <i>Campylobacter concisus</i> | | | | | | |
| <i>Granulicatella elgans</i> | | | | | | |
| <i>Veillonella dispar</i> | | | | | | |
| <i>Neisseria subflava</i> | | | | | | |
| <i>Actinomyces sp. oral taxon 180</i> | | | | | | |
| <i>Veillonella sp. oral taxon 780</i> | | | | | | |
| <i>Prevotella melaninogenica</i> | | | | | | |
| <i>Alloprevotella sp. oral taxon 473</i> | | | | | | |
| <i>Porphyromonas sp. oral taxon 930</i> | | | | | | |
| <i>Bergeyella sp. oral taxon 931</i> | | | | | | |
| <i>Porphyromonas pasteri</i> | | | | | | |
| <i>Lanchnoanaerobaculum umeaense</i> | | | | | | |

Evolução do microbioma oral humano e o seu impacto na saúde oral

| | | | | | | |
|---------------------------------------------|--|--|--|--|--|--|
| <i>Bergeyella sp. oral taxon 322</i> | | | | | | |
| <i>Fusobacterium periodonticum</i> | | | | | | |
| <i>Prevotella nanceiensis</i> | | | | | | |
| <i>Alloprevotella sp. oral taxon 308</i> | | | | | | |
| <i>Leptotrichia sp. oral taxon 215</i> | | | | | | |
| <i>Leptotrichia sp. oral taxon 221</i> | | | | | | |
| <i>Lautropia mirabilis</i> | | | | | | |
| <i>Abiotrophia defectiva</i> | | | | | | |
| <i>Sneathia sanguinegens</i> | | | | | | |
| <i>Capnocytophaga sputigena</i> | | | | | | |
| <i>Oribacterium sinus</i> | | | | | | |
| <i>Leptotrichia sp. oral taxon 417</i> | | | | | | |
| <i>Capnocytophaga granulosa</i> | | | | | | |
| <i>Corynebacterium durum</i> | | | | | | |
| <i>Cardiobacterium hominis</i> | | | | | | |
| <i>Propionibacterium sp. oral taxon 194</i> | | | | | | |
| <i>Corynebacterium matruchotii</i> | | | | | | |
| <i>Selenomonas sp. oral taxon 478</i> | | | | | | |
| <i>TM7[G-1] sp. oral taxon 352</i> | | | | | | |
| <i>Catonella morbi</i> | | | | | | |
| <i>Tannerella sp. oral taxon 286</i> | | | | | | |
| <i>Leptotrichia shahii</i> | | | | | | |
| <i>Staphylococcus caprae</i> | | | | | | |

(Adaptado de Dashper et al., 2019)

A espécie prevalente em todas as faixas etárias foi *Streptococcus mitis group*, embora tenha havido um decréscimo da sua abundância (a partir dos 19,7 meses) acompanhado pelo aumento da diversidade bacteriana (Dashper et al., 2019). Apesar do decréscimo, a sua abundância manteve-se estável entre os 19,7 e os 48,6 meses de idade.

Aos 1,9 meses de idade, apenas 7 espécies foram encontradas em $\geq 90\%$ das crianças. Aos 7,7 meses de idade, o número de espécies prevalentes duplicou. Voltou a duplicar aos 13,2 meses de idade, estabilizando até aos 48,6 meses de idade, ainda que com alterações na composição, verificando-se o aumento da diversidade bacteriana ao longo do tempo (**Tabela 3**) (Dashper et al., 2019).

A saliva das mães das crianças incluídas no estudo de Dashper e colaboradores em Vitoria, na Austrália, também foi recolhida, apenas num determinado momento, correspondente à segunda recolha da saliva das crianças, aos 7,7 meses de idade (Dashper et al., 2019). O microbioma salivar das mães foi bastante semelhante ao das crianças, apesar de se ter verificado um decréscimo acentuado na abundância das espécies *Gemella haemolysans* e *Streptococcus mitis* group e aumento da abundância das espécies *Streptococcus salivarius* group e *Prevotella melaninogenica*. Foram ainda encontradas espécies ausentes nas crianças, contribuindo para uma maior diversidade bacteriana: *Prevotella denticola*, *Prevotella salivae*, *Prevotella pallens*, *Prevotella oris*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus mutans* e *Treponema socranskii*. Foi ainda feita uma análise, na tentativa de correlacionar as espécies encontradas com estados de saúde e/ou doença, verificando-se, como seria de esperar, que *Streptococcus mutans* se encontrava aumentada em indivíduos com maior índice de cárie (Dashper et al., 2019)

Em Linkoping, na Suécia, Dizidic e colaboradores, caracterizaram longitudinalmente o microbioma salivar de 90 crianças aos 3, 6, 12 e 24 meses de idade e, mais tarde, aos 7 anos de idade (Dzidic et al., 2018). As regiões V3 e V4 do ARN ribossomal 16S foram sequenciadas através de um sequenciador *MiSeq* (*Illumina*). O número de bactérias por mL de saliva foi calculado através de PCR quantitativo. As sequências foram classificadas taxonomicamente através de uma plataforma online de classificação de sequências - *RDP classifier*, associando as sequências obtidas aos respetivos filos, classes, famílias e géneros. As unidades taxonómicas operacionais obtidas foram comparadas com a Base de Dados do Microbioma Oral Humano (HOMD) através de BLAST. Posteriormente, os microrganismos foram identificados e descritos por ordem cronológica de aparecimento na cavidade oral (Dzidic et al., 2018).

Entre os 3 a 6 meses de vida, as bactérias predominantes na cavidade oral em primeira instância, foram *Streptococcus spp.*, *Veillonella spp.* e *Lactobacillus spp.* (Dzidic et al.,

2018). Estes três géneros são característicos do leite materno e podem ser transmitidos às crianças por amamentação. Géneros bacterianos comuns às amostras de saliva recolhidas nos 5 momentos temporais foram: *Gemella*, *Granulicatella*, *Haemophilus* e *Rothia*, tendo a sua abundância aumentado com o tempo. Pelo contrário, verificou-se diminuição dos níveis de *Streptococcus* com a idade, especialmente nas crianças cujas mães cessaram a amamentação antes dos 12 meses de idade, o que poderá ser um indicador de que o estabelecimento deste género é favorecido pelo leite materno e ainda pela sua capacidade de aderir à mucosa (**Tabela 4**). Para além disso, os metabolitos do género *Streptococcus*, como o ácido láctico, provenientes da metabolização do leite materno, favorecem as condições do meio de um modo que permite outros microrganismos habitarem a cavidade oral (Dzidic et al., 2018).

Tabela 4– Microbioma encontrado aos 3, 6, 12, 24 e 178 meses de idade em crianças suecas no estudo de (Dzidic et al., 2018).

| | Idade (meses) | 3 | 6 | 12 | 24 | 178 |
|-----------------------------------------------------|----------------------|----------|-----------|-----------|------------|------------|
| PRIMEIROS COLONIZADORES | <i>Streptococcus</i> | 75-90% | 70-80% | 60-80% | 70% | 60-70% |
| | <i>Veillonella</i> | 5-7% | 5-7% | 1-3% | 1-2% | 1-3% |
| | <i>Lactobacillus</i> | 0,4-1% | 0,0-0,5% | 0 | 0 | 0 |
| GÉNEROS PRESENTES ENTRE 3-178 MESES DE IDADE | <i>Gemella</i> | 5-7% | 7-9% | 5-10% | 9-10% | 7-10% |
| | <i>ranulicatella</i> | 1-3% | 3-5% | 4-6% | 5-7% | 5-8% |
| | <i>aemophilus</i> | 0,5-2% | 0,5-1% | 0-1% | 0,5-1,5% | 1,5-3% |
| | <i>othia</i> | 0-1% | 0-1% | 0-1% | 0,5-2,5% | 2-2,5% |
| COLONIZADORES TARDIOS | <i>Abiotrophia</i> | 0-2% | 0 | 0-1% | 3-4% | 1-3% |
| | <i>Neisseria</i> | 0-1% | 0,5-2% | 0,5-2% | 1,5-2,5% | 3-4% |
| | <i>Actinomyces</i> | 0,5-1% | 0,5-1% | 0,5-1% | 0,75-1,25% | 1,25-1,75% |
| | <i>Porphyromonas</i> | 0-0,5% | 0,25-0,6% | 0-0,6% | 0,4-0,6% | 0,6-1,5% |

Bactérias presentes na cavidade oral mais tardiamente, aparecendo após a erupção das primeiras peças dentárias (6-8 meses), incluíram os géneros *Porphyromonas*, *Abitrophia* e *Neisseria* (Dzidic et al., 2018). Estes géneros passaram a fazer parte dos géneros predominantes após o primeiro ano de vida. Apesar de haver um decréscimo na percentagem de *Streptococcus* após terminada a fase de amamentação (primeiro ano de vida), este género permaneceu o mais abundante até aos 178 meses (**Tabela 4**).

Em Sichuan, na China, 96 crianças saudáveis com idades compreendidas entre os 3 e 6 anos participaram num estudo com o objetivo de testar os efeitos da raiz de *Glycyrrhiza uralensis* na diversidade do microbioma oral salivar (Chen et al., 2019). O método utilizado envolveu a recolha de amostras de saliva, submetidas a temperatura de -80°C e a as regiões V3 e V4 amplificadas do ARN ribossomal 16S foram sequenciadas através da plataforma *Illumina*. Foi constituído um grupo controlo com 14 crianças que não foi submetido a qualquer tratamento. Deste grupo foi analisada a saliva de 5 crianças no início do estudo e 3 semanas após. Neste trabalho descreve-se os resultados obtidos neste grupo controlo.

Os dados obtidos foram analisados pelo programa QUIIME (*Quantitative Insights into Microbial Ecology*) na versão 1.9.1 e as sequências foram agrupadas em Unidades Taxonómicas Operacionais com UCLUST e posteriormente alinhadas e classificadas taxonomicamente tendo como referência a base de dados do microbioma oral humano (HOMD) (Chen et al., 2019).

A identificação taxonómica do microbioma das crianças incluídas no grupo controlo foi conseguida até ao nível do género, sendo o género *Prevotella* o mais abundante transversalmente (**Figura 12**). Foram também identificados os seguintes géneros: *Haemophilus*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Alloprevotella* e *Bacteroides* (Chen et al., 2019).

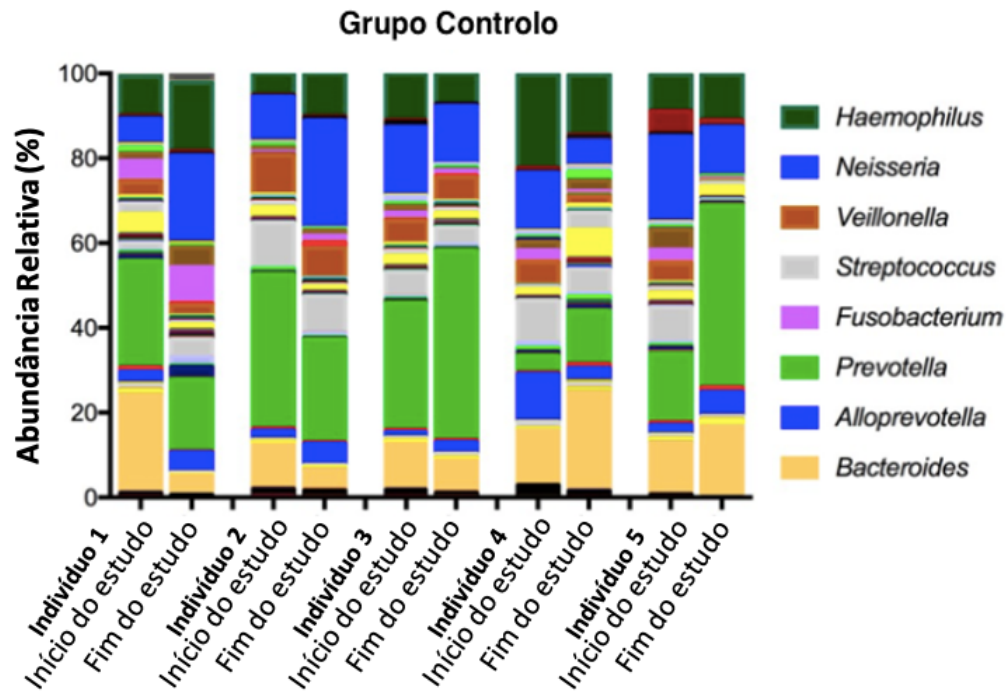


Figura 12 - Abundância relativa (%) dos gêneros encontrados na saliva de 5 crianças chinesas no início e 3 semanas após. (Adaptado de Chen et al., 2019).

O grupo controlo obteve consultas de instrução de técnicas de higiene oral, podendo justificar as alterações de abundância relativa observadas na **Figura 12**.

Premaraj e colaboradores, avaliaram as diferenças no microbioma oral supragengival entre diferentes grupos étnicos incluindo 25 crianças hispânicas (14 raparigas e 11 rapazes), 26 crianças caucasianas (12 raparigas e 14 rapazes), 19 crianças birmanesas (7 raparigas e 12 rapazes) e 26 crianças afroamericanas (10 raparigas e 16 rapazes) residentes no Nebraska, Estados Unidos da América, com idades compreendidas entre os 6 e os 11 anos (Premaraj et al., 2020). O microbioma foi analisado por sequenciação das regiões V3-V4 do ARN ribossomal 16S usando a tecnologia NGS *Illumina Miseq* (Premaraj et al., 2020).

Os gêneros *Capnocytophaga*, *Prevotella*, *Leptotrichia*, *Selenomonas*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Cornybacterium*, *Neisseria*, *Veillonella* e *TM7-genera-incertae-sedis* foram transversalmente predominantes nos quatro grupos étnicos (**Figura 13**). Apesar de não se ter verificado uma diferença significativa entre os diferentes grupos étnicos, 17

espécies foram encontradas exclusivamente na amostra de crianças birmanesas, em aproximadamente 50% do grupo, indicando que é provável que as espécies sejam características da etnia birmanesa (**Figura 14**) (Premaraj et al., 2020). As 17 espécies não foram apresentadas no estudo, apenas é mencionado que a espécie mais abundante pertence ao gênero *Sneathia*. As restantes diferenças no microbioma oral de cada grupo não foram significativas.

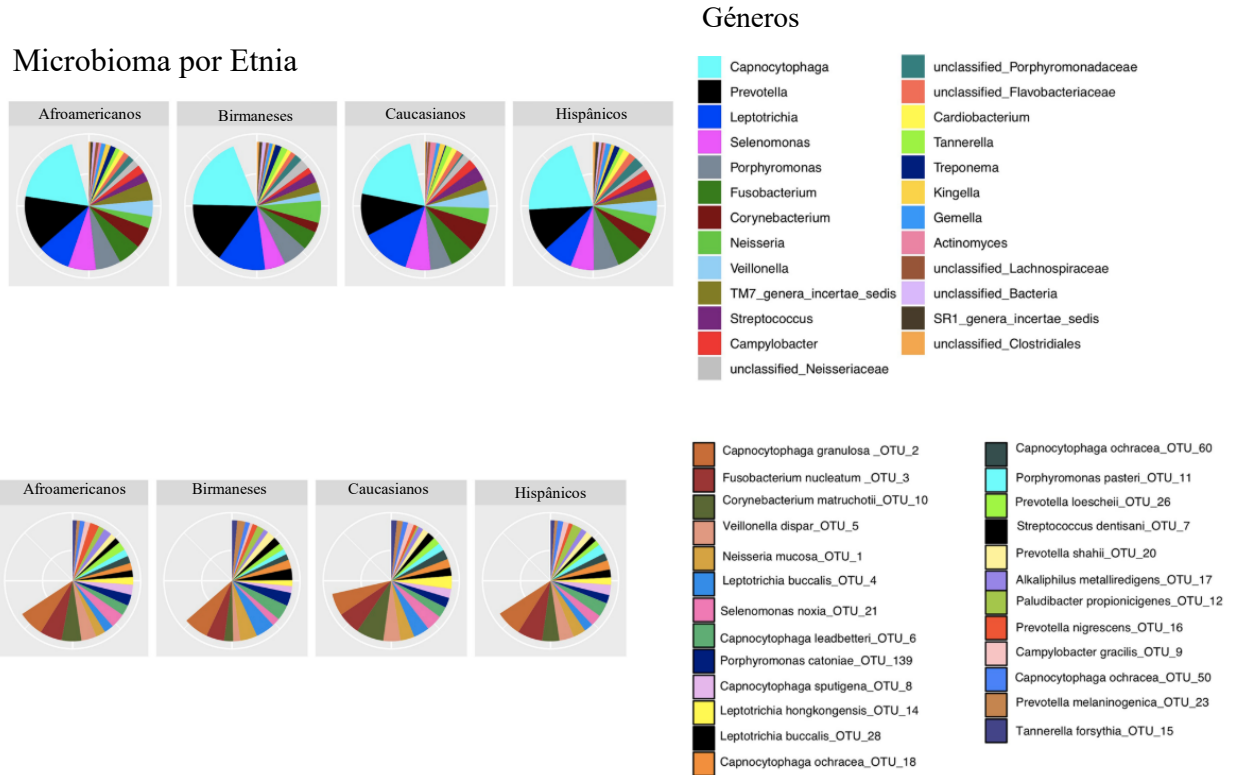


Figura 13 - Composição do microbioma supragingival e abundâncias dos gêneros em crianças divididas em quatro grupos étnicos (afroamericanos, birmaneses, caucasianos e hispânicos). Capnocytophaga foi o gênero mais abundante no estudo por (Premaraj et al., 2020).

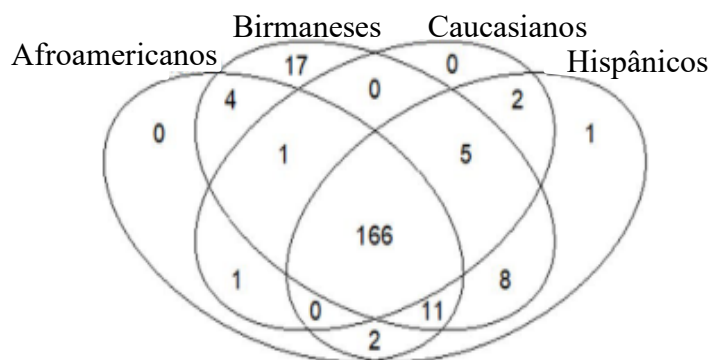


Figura 14 - Espécies em comum e características do microbioma supragingival em cada etnia representadas em Diagrama de Venn, das crianças em estudo em (Premaraj et al., 2020).

A comparação entre o microbioma das crianças revelou que as espécies prevalentes no microbioma oral foram *Capnocytophaga* (18.9% da totalidade de bactérias), *Prevotella* (12.5%), *Leptotrichia* (10%) nos 4 grupos étnicos. Sendo que a localização geográfica, o clima, a dieta, as características do hospedeiro podem induzir alterações no microbioma oral, quando normalizados os fatores possíveis como a frequência de higienização oral, os microbiomas não sofreram alterações, sugerindo que, a etnia por si só, pode representar uma variável independente que afeta o perfil do microbioma oral. Este estudo concluiu que, assim como os adultos, as crianças podem ter uma pré-disposição para adquirir um determinado microbioma de acordo com a sua etnia (Premaraj et al., 2020).

Em Qingdao e Guangzhou, na China, foram recolhidas amostras salivares de 65 crianças saudáveis e 65 crianças com cáries ativas para análise por Li e colaboradores, com o intuito de estudar o microbioma salivar e perceber se varia durante a dentição mista de acordo com a presença ou ausência de cárie, se a localização geográfica tem influência no microbioma salivar e se o fator geográfico se deve ter em consideração aquando da construção de classificadores que distinguem grupos controlo saudáveis de grupos com doença (Li et al., 2021).

Foram escolhidas as cidades Qingdao e Guangzhou por se localizarem em polos opostos da china (a norte e a sul respetivamente) e, assim, poder ser testado o efeito de distância geográfica. As regiões V1-V3 do ARN ribossomal 16S foram sequenciadas através do método NGS pirosequenciação e os resultados foram analisados nas plataformas MOTHUR, QUIIME e R *scripts* (Li et al., 2021).

Neste estudo, houve diferença estatisticamente significativa no microbioma salivar quando comparados os grupos com cárie dentária com os grupos saudáveis, no entanto, não houve diferença significativa entre quando o microbioma foi comparado entre géneros (**Figura 15**) (Li et al., 2021).

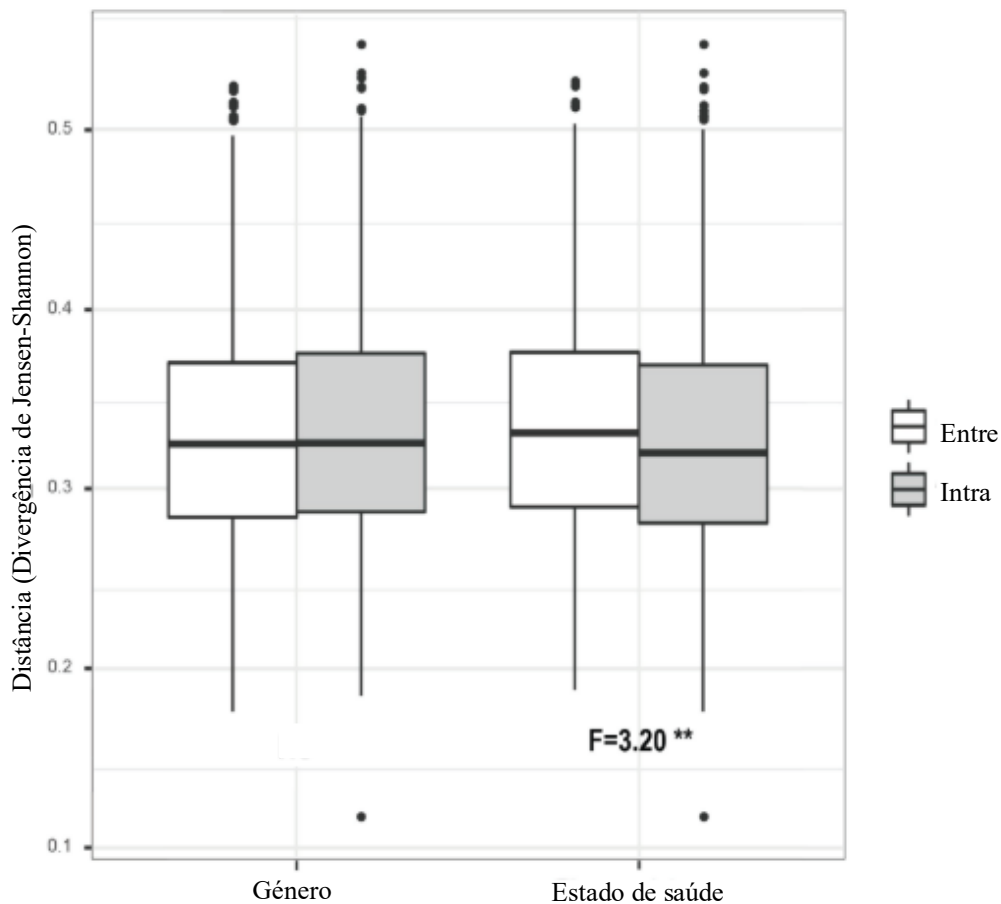


Figura 15 - Diferença estatística no microbioma salivar intra e entre grupos saudáveis e doentes e entre gêneros das crianças em estudo em (Li et al., 2021). (Adaptado de Li et al., 2021).

O grupo de doentes com cárie dentária revelou ter menos diversidade bacteriana no seu microbioma salivar e os gêneros prevalentes por ordem de média de abundância relativa (%) foram: *Streptococcus* (51,4%), *Gemella* (11,2%), *Actinomyces* (8,7%) e *Granulicatella* (5,8%). Na comparação entre grupo saudável e grupo doente, espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Gemella*, *Cryptobacterium* e *Mitsuokella* foram mais abundantes no grupo doente, enquanto que espécies dos gêneros *Leptotrichia*, *Porphyromonas*, *Peptococcus*, *TM7* e *Tannerella* foram mais abundantes no grupo saudável. A nível de espécies, *Actinomyces IP073*, *Lactobacillus gasseri*, *Prevotella denticola*, *Propionibacterium FMA5*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Actinomyces gerencseriae* apresentaram maior abundância

relativa no grupo doente e *Porphyromonas catoniae*, *Porphyromonas CW034*, *Propionibacterium propionicum*, *Tannerella oral taxon 808*, *TM7 oral taxon 352* e *Lachnospiraceae oral taxon 100* revelaram maior abundância relativa no grupo saudável (**Figura 16**) (Li et al., 2021).

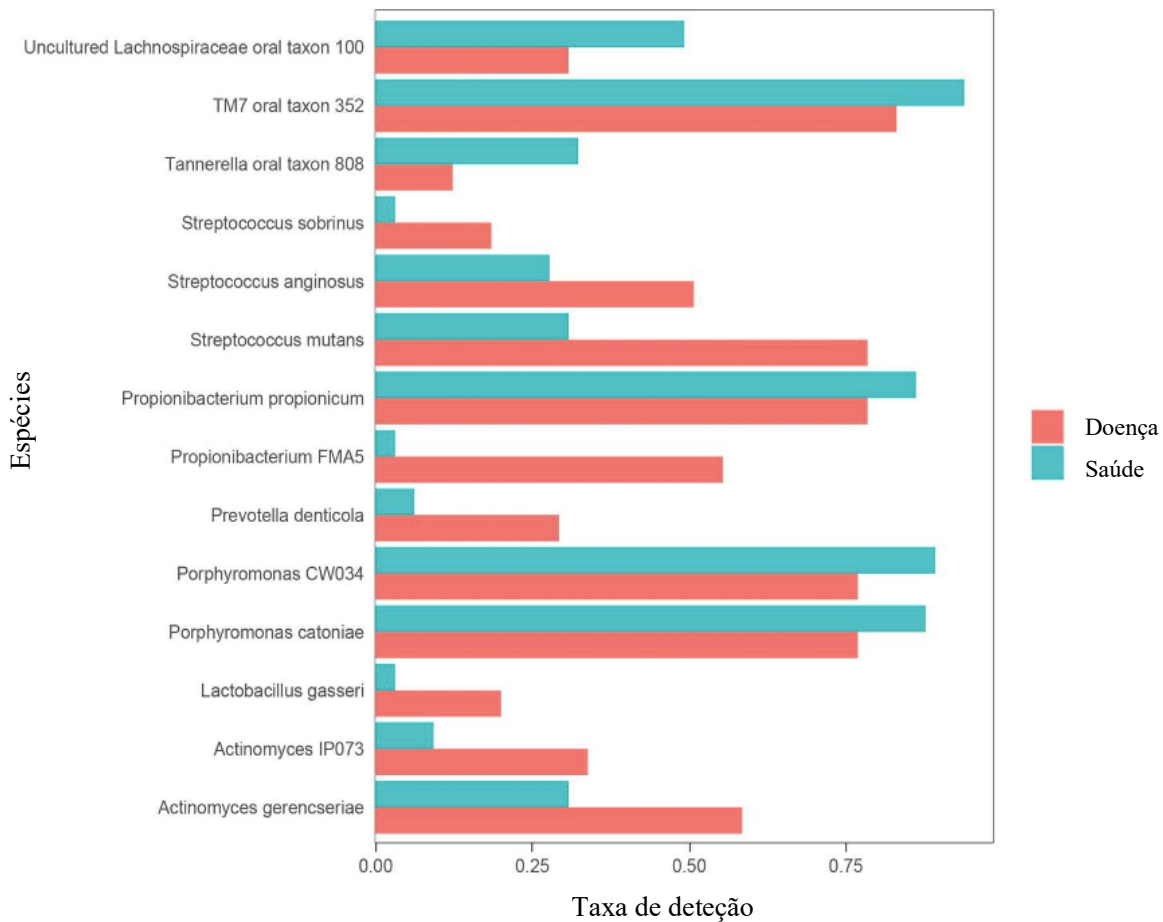


Figura 16 - Frequência de presença de 14 espécies no microbioma salivar das crianças divididas em dois grupos: grupo com presença de cárie (doença) e ausência de cárie (saúde) em estudo em (Li et al., 2021). (Adaptado de Li et al., 2021).

Para avaliar a diferença de microbioma salivar entre localização geográfica, um grupo de 34 crianças da mesma região do sul da China que 65 das crianças inicialmente incluídas no estudo (Guangzhou) entre os 6 e os 8 anos de idade, foi adicionado ao estudo (Li et al., 2021). Neste grupo, 17 crianças tiveram lesões de cárie e 17 foram saudáveis.

A análise estatística revelou que a localização geográfica demonstrou ter maior influência na diferença do microbioma das crianças que o gênero ou a presença ou ausência de cáries (**Figura 17**) (Li et al., 2021).

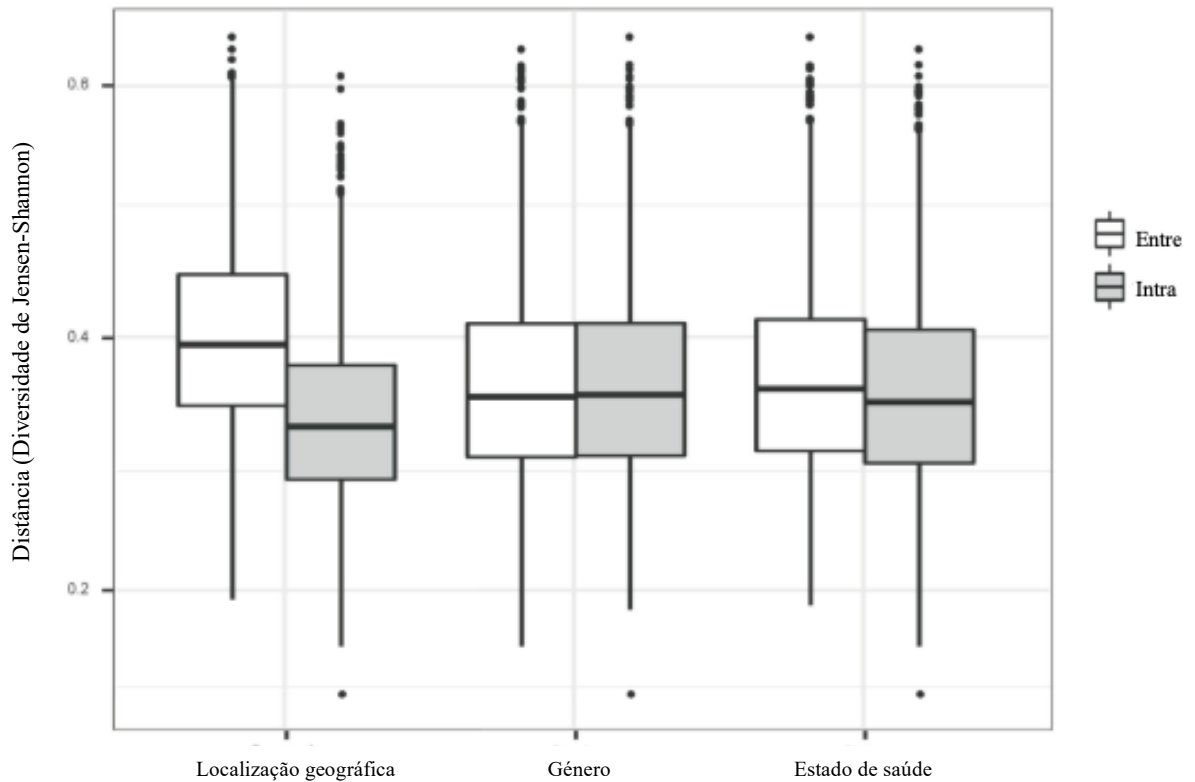


Figura 17 - Análise da diferença do impacto das variáveis: localização geográfica, gênero e estado de saúde no microbioma salivar através da divergência de Jensen-Shannon das crianças em estudo em (Li et al., 2021). (Adaptado de Li et al., 2021).

Para identificar espécies como marcadores específicos de região geográfica, foi utilizado um algoritmo com capacidade de aprendizagem e previsão - *Random Forest* (Li et al., 2021). A partir deste algoritmo, 8 espécies foram identificadas como sendo as que melhor permitiam prever a região de um indivíduo com base na sua presença no microbioma. As 8 espécies foram: *Veillonella atypica/dispar/parvula*, *Granulicatella elegans*, *Corynebacterium durum*, *Rothia aeria*, *Bergeyella 602D02*, *Granulicatella adiacens*, *Peptostreptococcus stomatis* e *Streptococcus parasanguinis oralis*.

Independentemente da presença ou ausência de cárie e do gênero das crianças, o microbioma foi evidentemente distinto entre as duas localizações geográficas consideradas neste estudo, revelando a importância deste fator na caracterização do microbioma oral (**Figura 18**) (Li et al., 2021).

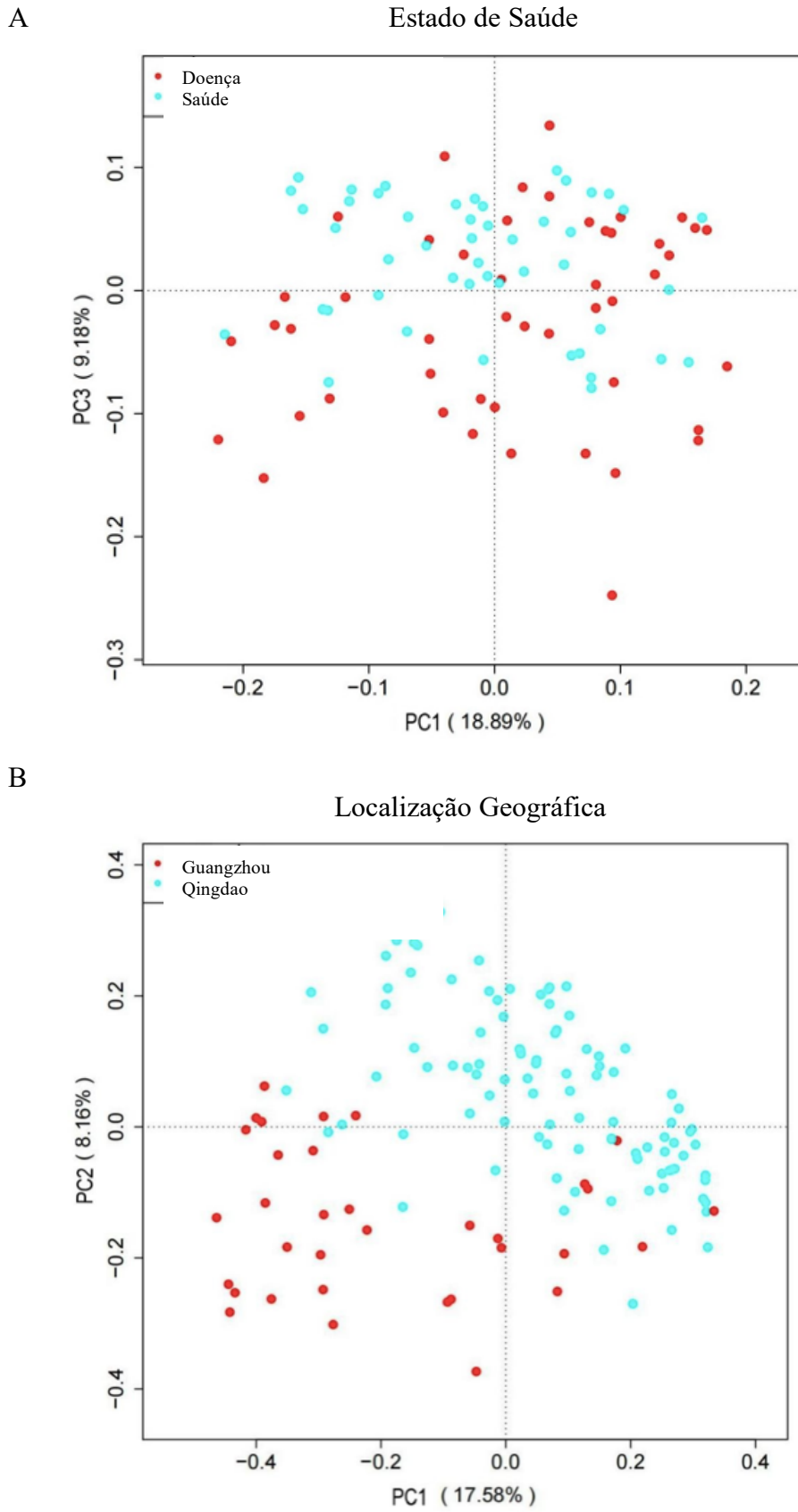


Figura 18 - Análise de coordenadas principais da matriz de distância das variáveis: microbioma salivar consoante o estado de saúde (A) e localização geográfica (B) através da divergência de Jensen-Shannon nas crianças em estudo em (Li et al., 2021). (Adaptado de Li et al., 2021).

Burcham e colaboradores, compararam a diversidade do microbioma oral entre uma população jovem de 179 indivíduos com idades compreendidas entre os 8 e os 17 anos de idade (71 rapazes e 108 raparigas) e uma população adulta de 172 indivíduos com idades compreendidas entre os 20 e os 75 anos de idade (49 homens e 123 mulheres) (Burcham et al., 2020). Todos os indivíduos em estudo, 303 (86,3%) eram caucasianos e residentes ou visitantes de Denver nos Estados Unidos da América (Burcham et al., 2020). As amostras salivares foram recolhidas através de raspagem da mucosa jugal. A região V4 do ARN ribossomal 16S foi sequenciada através do método NGS *Illumina MiSeq*. A classificação taxonómica foi atribuída com recurso à base de dados *Greengenes 13.8*.

A população jovem apresentou maior variedade a nível de espécies bacterianas relativamente à idade adulta, apesar de não ter havido uma diferença estatisticamente significativa (**Figura 19**) (Burcham et al., 2020). Todos os géneros encontrados na idade adulta foram também encontrados no microbioma oral da população jovem, sendo os predominantes em ambas as faixas etárias os géneros *Streptococcus* e *Haemophilus*, *Rothia*, *Neisseria* e *Veillonella* (**Figura 20**). Em conjunto, estes 5 géneros representaram 85.4% do microbioma oral da população adulta e 71.7% do microbioma oral encontrada na população mais jovem (Burcham et al., 2020).

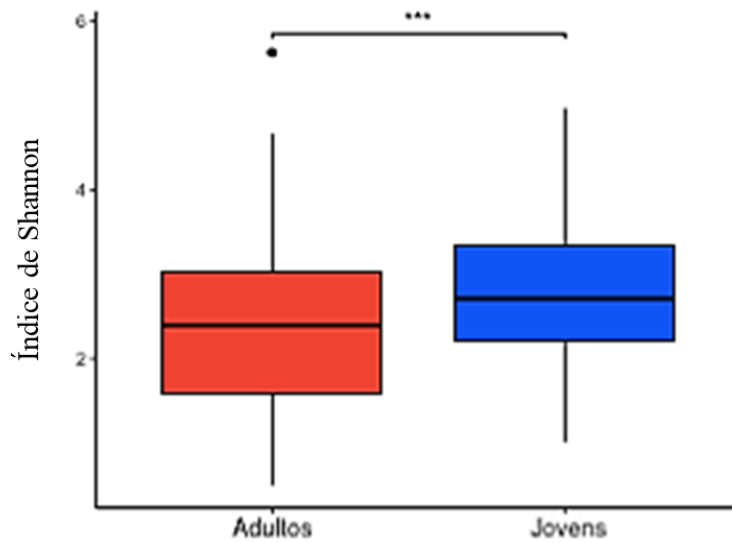


Figura 19 - Análise da diversidade entre microbiomas salivares de jovens e adultos no estudo de (Burcham et al., 2020).

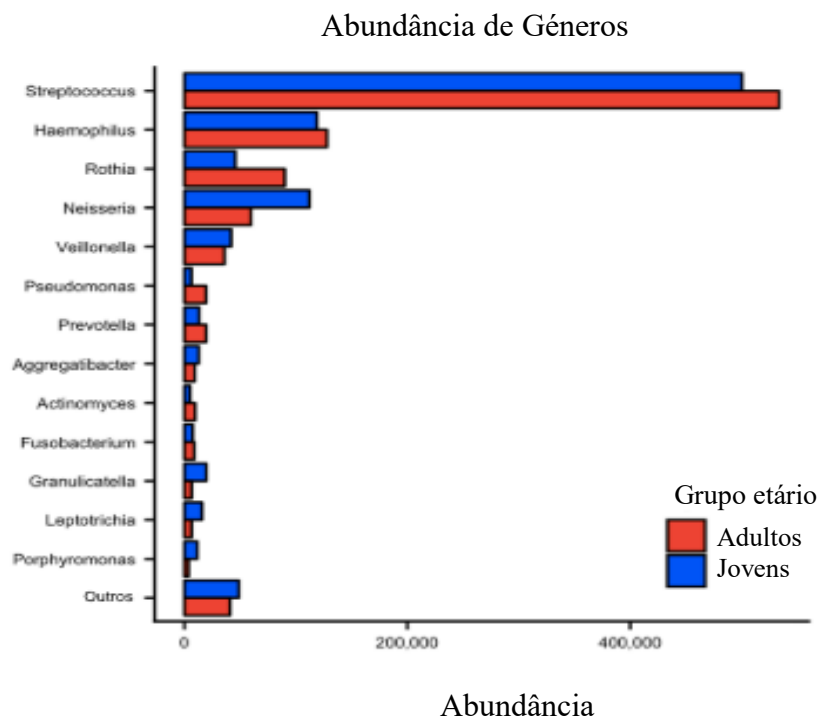


Figura 20 - Abundância de gêneros do microbioma salivar da população jovem e adulta no estudo de (Burcham et al., 2020)

A análise estatística da composição dos microbiomas (ANCOM), revelou 12 gêneros com abundâncias bastante diferentes entre os dois grupos (**Figura 21**): *Abiotrophia* encontrada maioritariamente em jovens, *Granulicatella* e *Treponema* encontrada em maiores

percentagens nos adultos (**Tabela 5**). O género *Treponema* faz parte do complexo vermelho de bactérias associadas à doença periodontal (Burcham et al., 2020).

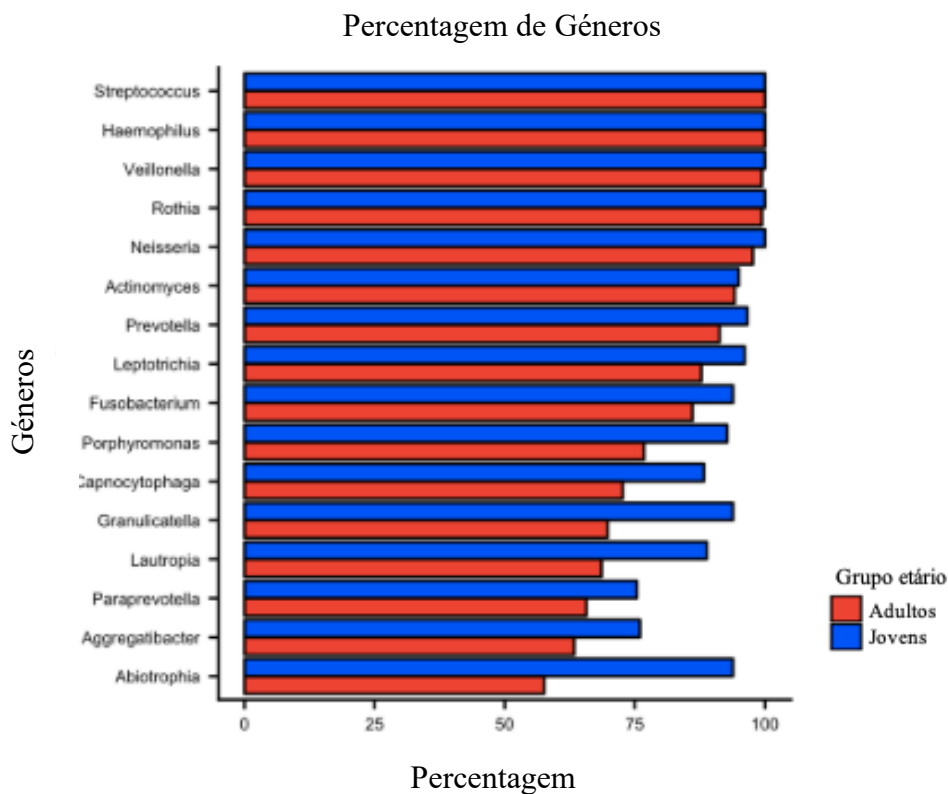


Figura 21 - Composição do microbioma (%) dos jovens e adultos no estudo de (Burcham et al., 2020)

Tabela 5 - Géneros com abundâncias diferentes entre jovens e adultos no estudo de (Burcham et al., 2020) ANCOM determinou abundância de género diferencial através da mediana (percentil mediano) e número de contagem da sequência mais elevada encontrada (percentil máximo). F representa a diferença do tamanho de efeito dos géneros entre os dois grupos.

| Género | Percentil Mediano Abundância | | Percentil Máximo Abundância | | F |
|-----------------------|---------------------------------|--------|--------------------------------|--------|-------|
| | Adultos | Jovens | Adultos | Jovens | |
| <i>Abiotrophia</i> | 5,5 | 48,0 | 478,0 | 1217,0 | 107,3 |
| <i>Granulicatella</i> | 16,0 | 152,0 | 1345,0 | 1863,0 | 67,3 |
| <i>Treponema</i> | 1,0 | 1,0 | 2116,0 | 78,0 | 52,0 |
| <i>Porphyromonas</i> | 14,0 | 54,0 | 890,0 | 1712,0 | 42,8 |

| | | | | | |
|------------------------|-------|-------|---------|--------|------|
| <i>Capnocytophaga</i> | 9,5 | 27,0 | 402,0 | 1866,0 | 39,7 |
| <i>Lautropia</i> | 8,0 | 19,0 | 1423,0 | 866,0 | 35,4 |
| <i>Neisseria</i> | 235,5 | 546,0 | 14752,0 | 9859,0 | 26,5 |
| <i>Leptotrichia</i> | 25,0 | 54,0 | 899,0 | 2793,0 | 22,0 |
| <i>Atopobium</i> | 1,0 | 1,0 | 82,0 | 34,0 | 41,8 |
| <i>Megasphaera</i> | 1,0 | 1,0 | 289,0 | 27,0 | 41,6 |
| <i>Cardiobacterium</i> | 1,0 | 1,0 | 40,0 | 426,0 | 15,7 |
| <i>Actinobacillus</i> | 1,0 | 11,0 | 2365,0 | 4869,0 | 14,1 |

(Adaptado de Burcham et al., 2020)

Relativamente às diferenças no microbioma oral consoante o género, apesar de ter havido diferenças entre o microbioma masculino e feminino dos jovens, nenhum género bacteriano se conseguiu atribuir a esta diferença (**Figura 22**) (Burcham et al., 2020). Entre adultos, não houve diferença entre homens e mulheres. Não se conseguiu chegar a uma conclusão relativamente ao motivo da diferença observada em jovens. Uma possível causa mencionada foi a diferença nos hábitos de higiene oral, sendo mais rigorosos no género feminino. Uma das limitações do estudo passa por não terem sido consideradas diferenças hormonais aquando do estudo.

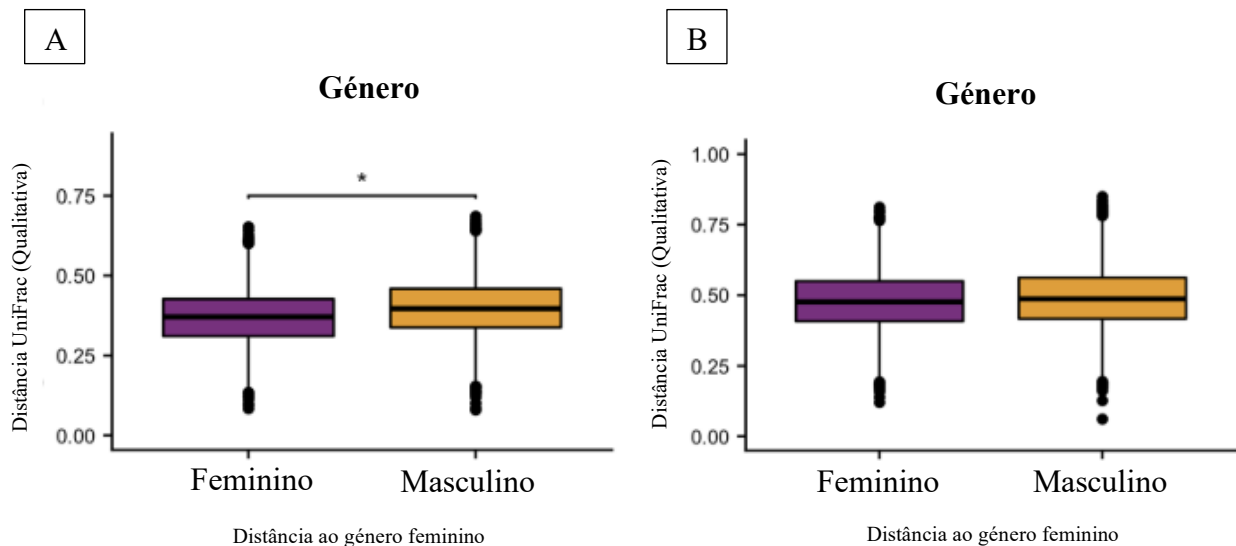


Figura 22 - Beta diversidade qualitativa entre jovens (A) e adultos (B) do género feminino e masculino no estudo de (Burcham et al., 2020).

Em Fukuoka, no Japão, analisou-se o microbioma oral da língua de 73 adultos saudáveis com idades compreendidas entre os 20 e os 29 anos (Kageyama et al., 2019). As amostras foram recolhidas através da raspagem do dorso da língua e foram sequenciadas as regiões V1 e V2 do ARN ribossomal 16S com o sistema *Ion* PGM. A classificação taxonómica foi feita com BLAST, comparando as sequências com as disponibilizadas no HOMD 16S *RefSeq* versão 14.51. Esta análise foi feita com o objetivo de obter valores de referência para fins de comparação com o microbioma da língua de 8 bebés com idades entre as 13 e as 26 semanas de vida, seguidos e investigados durante um período de aproximadamente dois anos.

O número de espécies encontradas no microbioma da língua dos bebés, aumentou rapidamente com a idade até às 80 semanas, não tendo sido feitas distinções entre género (Figura 23) (Kageyama et al., 2019). Definiram como fase exponencial a fase que compreende as idades entre as 10 e as 29 semanas e como fase transitória a fase entre as 80 e as 120 semanas que corresponde ao fim da fase exponencial até à fase estacionária. A diversidade alfa na fase transitória foi muito superior à fase exponencial em todos os indivíduos. A fase transitória não revelou diferenças da fase adulta, com exceção de um indivíduo da amostra, sugerindo que a diversidade do microbioma da língua atinge valores semelhantes aos encontrados no adulto aquando da fase transitória (Kageyama et al., 2019).

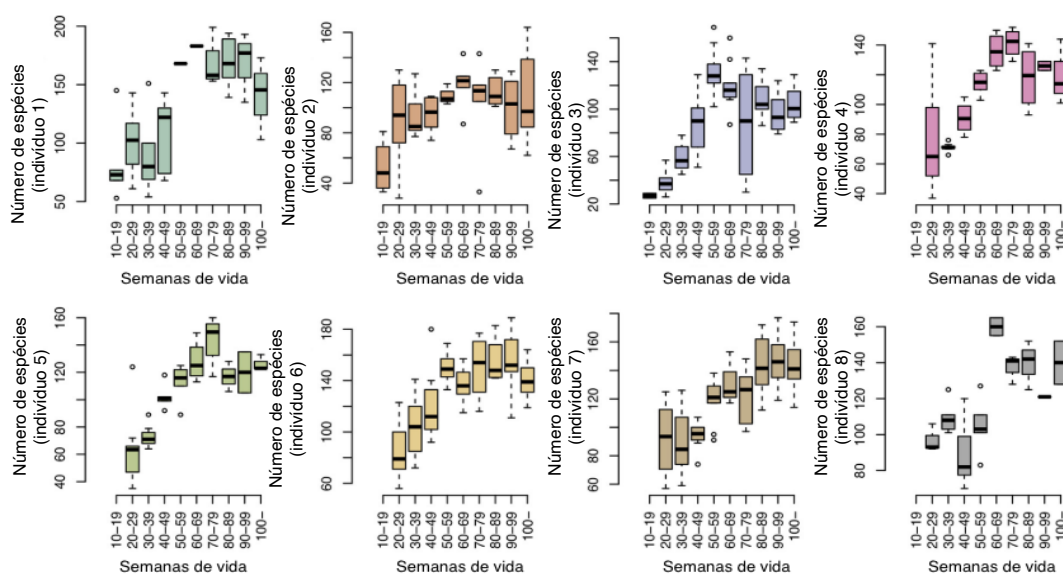


Figura 23 - Transição da diversidade bacteriana em cada criança (n=8). Os diagramas de caixa representam o número de espécies encontradas consoante a idade. (Adaptado de Kageyama et al., 2019).

No período entre as 10 e as 29 semanas de vida (fase exponencial), o microbioma oral revelou-se escasso, sendo o microbioma dominante desta fase composto por: *Streptococcus peroris*, *Streptococcus species*, *Streptococcus lactarius*, *Actinomyces lingnae*, *Rothia species*, *Gemella haemolysans* e duas espécies do género *Streptococcus* que não foram determinadas (**Figura 24**) (Kageyama et al., 2019). Entre as 80 e as 120 semanas de vida (fase transitória), as espécies dominantes foram *Neisseria mucosa*, *Streptococcus cristatus*, *Alloprevotella sp.*, *Lautropia mirabilis*, *Haemophilus sp.*, e duas espécies de *Streptococcus* não determinadas.

As espécies presentes nas três faixas etárias em estudo, foram: *Neisseria flavescens*, *Prevotella melaninogenica*, *Rothia mucilaginosa*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Veillonella rogosae*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mitis* (**Figura 24**) (Kageyama et al., 2019).

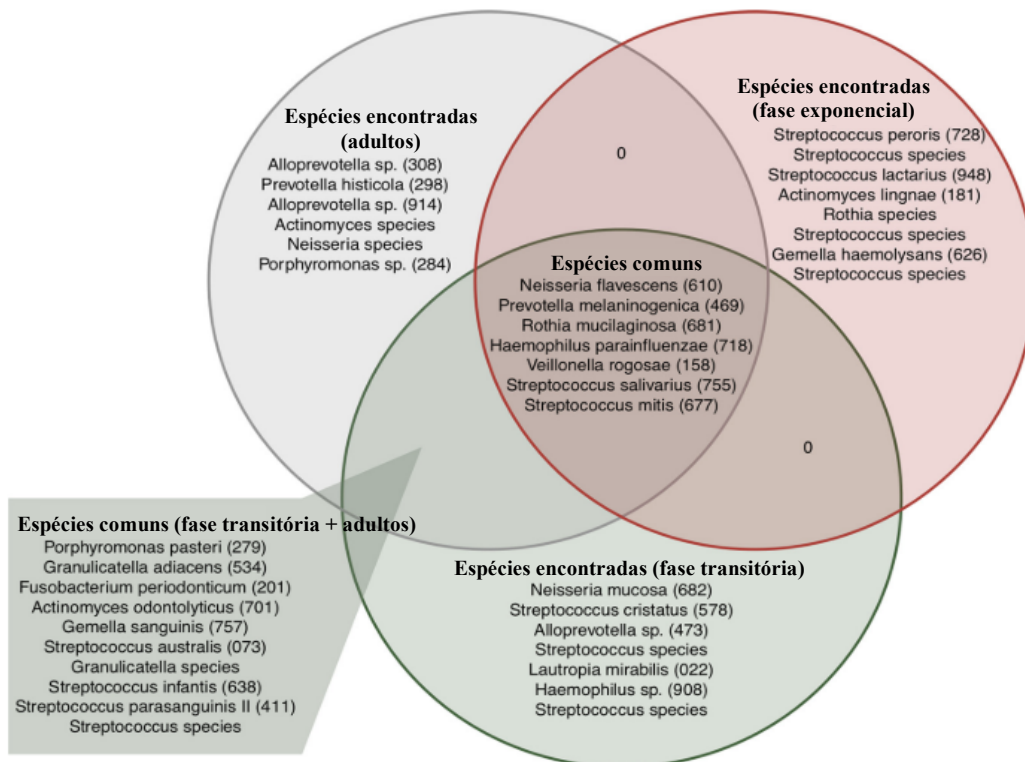


Figura 24 - Distribuição das espécies dominantes exclusivamente na respetiva faixa etária e as espécies comuns, representada em Diagrama de Venn, na população em estudo por Kageyama et al., em Fukuoka, Japão. A fase exponencial corresponde ao período entre as 10 e as 29 semanas de vida; a fase transitória corresponde ao período entre as 80 e as 120 semanas de vida. As espécies comuns foram prevalentes em todas as fases. A identificação das espécies de acordo com o eHOMD está representada entre parêntesis. (Adaptado de Kageyama et al., 2019).

O estudo de Tribble e colaboradores, realizado em 2019 no Texas, Estados Unidos da América, teve como objetivo verificar se a frequência da higienização do dorso da língua teria impacto no microbioma oral lingual. Foram caracterizados os microbiomas do dorso da língua de 27 indivíduos saudáveis (10 homens e 17 mulheres) de etnias diferentes (Caucasianos, hispânicos, afroamericanos, asiáticos, do médio oriente e asiáticos/caucasianos) (**Figura 25**), com idades superiores a 18 anos.

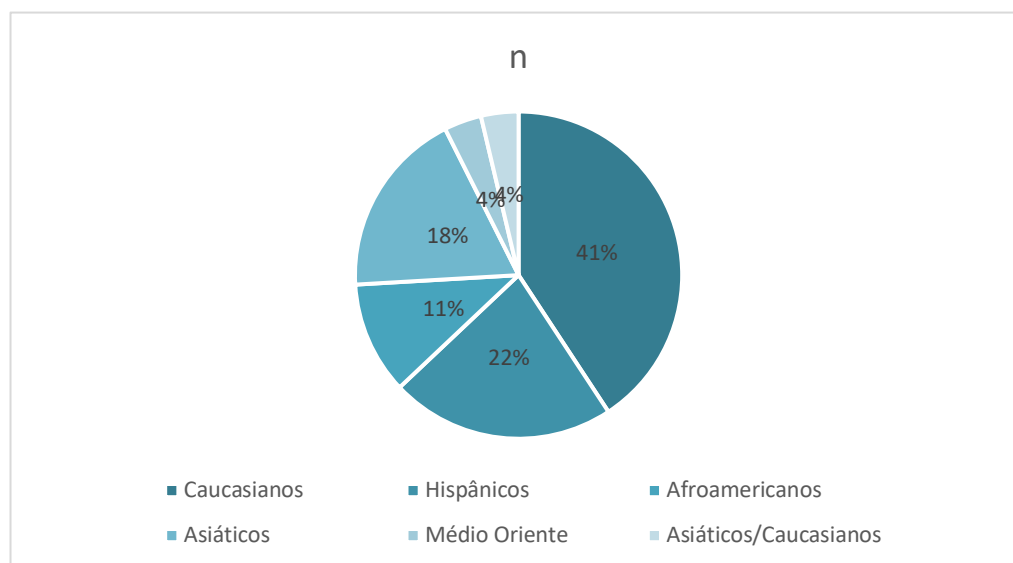


Figura 25 - Etnia da amostra de população estudada em (Tribble et al., 2019)

As amostras foram recolhidas em 4 momentos, sendo o primeiro momento o relevante a mencionar nesta tese, uma vez que ainda não havia sido iniciado qualquer tratamento (Tribble et al., 2019). O estudo do microbioma do dorso da língua, foi feito com recurso à sequenciação das regiões V3 a V4 do ARN ribossomal 16S usando a tecnologia NGS *Illumina (HiSeq 2000)*. As sequências obtidas foram comparadas com a informação disponibilizada na Base de Dados do Microbioma Oral Humano, para lhes serem atribuídas as respetivas classificações taxonómicas.

Neste estudo, os Filos predominantes foram: *Proteobacteria*, com uma prevalência de 40%, *Bacteroidetes* com 23% e, por fim, *Firmicutes* (Tribble et al., 2019). O género *Haemophilus* foi o mais comum (25%), tendo sido encontrado em 14 indivíduos. Seguiu-se o género *Prevotella* (18%), *Neisseria* (13%), *Streptococcus* (9%), *Leptotrichia* (6%), *Fusobacteria* (6%), *Veillonella* (6%), *Actinomyces* (4%), *Porphyromonas* (3%), *Lachnospira* (3%), *Flavobacteria* (2%), *Campylobacter* (2%), *Micrococcus* (1%) e

Carnobacteria (1%). As percentagens entre parêntesis representam a composição média no microbioma contemplando todos os indivíduos. Não foram analisadas diferenças entre género ou etnia (Tribble et al., 2019).

As conclusões retiradas deste estudo, foram que a higienização do dorso da língua tem efeitos na regulação da tensão arterial, tendo em conta que a higienização favorece o aumento da abundância de espécies que metabolizam nitratos/nitritos como a espécie *Haemophilus parainfluenzae* e *Neisseria spp.* (Tribble et al., 2019). A via no nitrato-nitrito enterosalivar é fundamental para a saúde cardiovascular, uma vez que o nitrito reduzido tem propriedades vasodilatadoras de vasos periféricos. Apesar do mecanismo ainda ser desconhecido, há uma relação entre a redução do nitrito a NO e a vasodilatação a nível periférico, resultando numa tensão arterial mais baixa (Tribble et al., 2019).

Bescos e colaboradores, avaliaram o efeito da clorhexidina no microbioma salivar numa amostra de 36 indivíduos britânicos, sem referir a localidade, apenas que se trataram de indivíduos saudáveis com idade média de 26 anos. O estudo foi realizado ao longo de 14 dias, sendo nos primeiros 7 dias efetuado tratamento placebo durante 1 minuto, duas vezes ao dia e, nos restantes 7 dias, bochechos de clorhexidina 0,2% com a mesma frequência e duração do tratamento com placebo (Bescos et al., 2020). O tratamento placebo constitui uma ferramenta inerte que, por esse motivo, permite avaliar os efeitos de uma substância de interesse através de comparação de resultados entre os dois grupos - submetidos a tratamentos com substâncias ativas e tratamento placebo (Enck & Klosterhalfen, 2019).

A saliva dos indivíduos foi recolhida e mantida a temperaturas de -80°C, sendo de seguida feita a sequenciação metagenómica do microbioma oral. Para classificar os filos e géneros bacterianos, foi usado o método Análise Discriminante Linear e Tamanho do efeito da análise discriminante linear (LDA/LEfSe) e a análise bioinformática para calcular a relação entre Unidades Taxonómicas Operacionais foi feita com *OTUs_biom/MicrobiomeAnalysit* (Bescos et al., 2020).

Os resultados obtidos nos doentes tratados com placebo, correspondem ao microbioma normal numa população adulta e revelaram que o microbioma oral foi constituído maioritariamente pelo género *Prevotella* (30%), seguido de *Streptococcus* (20%), *Veillonella* (10%), *Actinomyces* (<10%), *Neisseria* (<5%), *Granulicatella* (<5%), *Rothia*

(<5%), *Porphyromonas* (<5%) e, em menor percentagem, foram encontrados os géneros *Fusobacterium*, *Capnocytophaga*, *Leptotrichia*, *Bulleidia*, *Megasphaera*, *Selenomonas*, *Haemophilus* e *Campylobacter*, perfazendo uma percentagem de aproximadamente 10% do microbioma total encontrado (**Figura 26**) (Bescos et al., 2020). Neste estudo não foram mencionadas variações inter-indivíduo, apenas as percentagens de espécies encontradas no conjunto de amostras de saliva recolhidas.

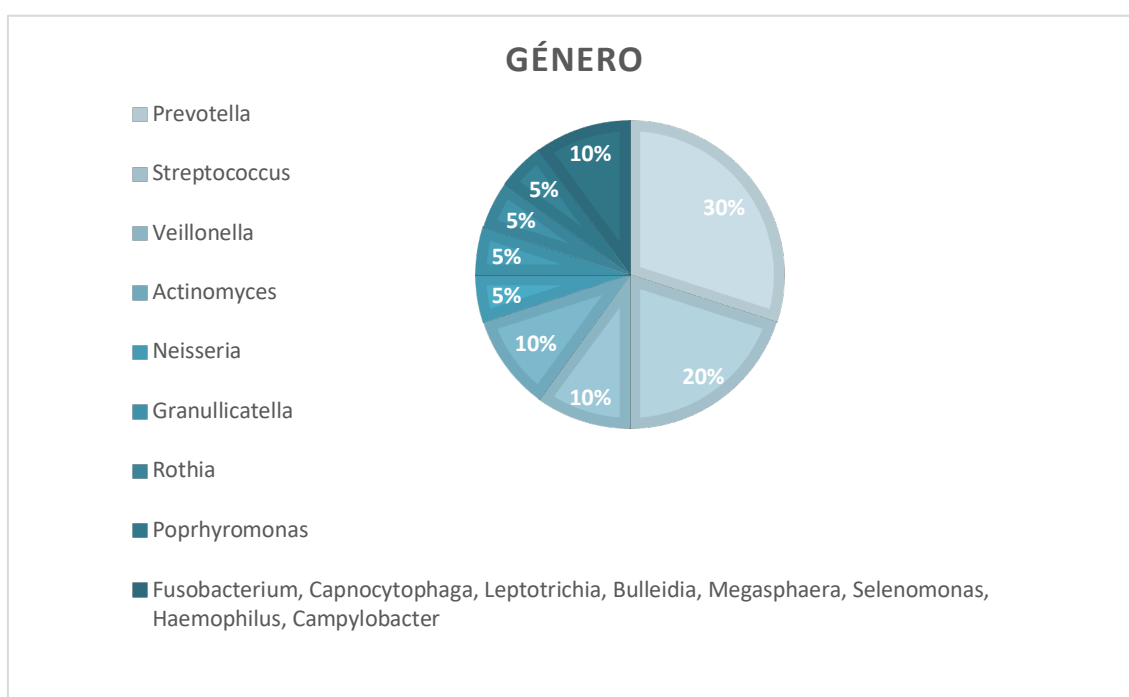


Figura 26 – Distribuição do microbioma encontrado numa amostra de população britânica no estudo de (Bescos et al., 2020).

Um estudo de Ihara e colaboradores, com uma amostra de 74 participantes residentes em Kyushu, no Japão, com idades compreendidas entre os 20 e os 32 anos, analisou o microbioma da placa bacteriana por ordem de adesão ao esmalte durante um período de 6 horas, com recurso a sequenciação do ARN ribossomal 16S completo com *PacBio Sequel*, com o objetivo de identificar a composição bacteriana do microbioma correspondente aos primeiros estádios da formação da placa bacteriana.

Apesar de 18 dos participantes apresentarem lesões de cárie ativas, as comunidades bacterianas não tiveram diferenças significativas (Ihara et al., 2019). Apresentaram, no entanto, contagens de bactérias superiores às dos participantes sem lesões de cárie. Dessa

análise, 21 espécies predominantes foram identificadas, sendo a mais predominante *Streptococcus mitis* sp., seguida de *Neisseria* (*sicca*, *flava* e *mucosa*), *Streptococcus oralis*, *Rothia dentocariosa*, *Streptococcus* sp., *Haemophilus parainfluenzae*, *Gemella haemolysans*, *Porphyromonas pasteri*, *Streptococcus australis*, *Neisseria subflava*, *Lautropia mirabilis*, *Rothia aeria*, *Neisseria oralis*, *Abiotrophia defectiva*, *Streptococcus infantis*, *Neisseria flavescens*, *Streptococcus sanguinis* e *Rothia mucilaginoso* (**Figura 27**) (Ihara et al., 2019).

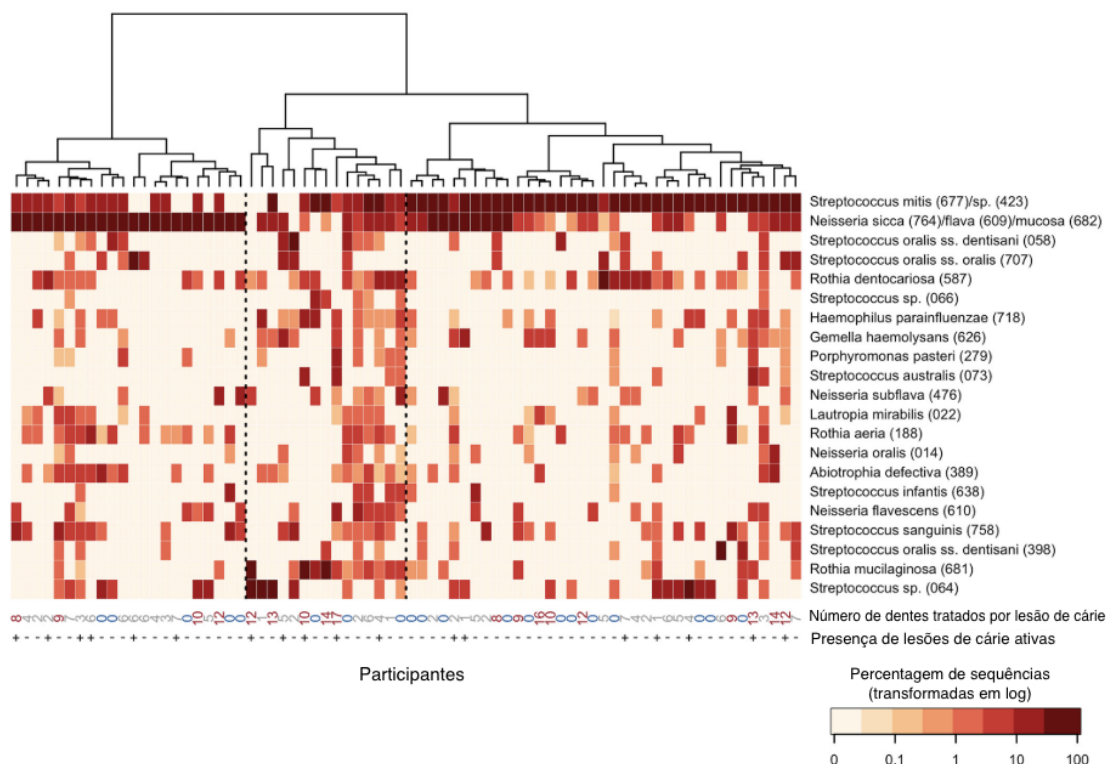


Figura 27 - Abundância relativa das 21 espécies prevalentes de cada indivíduo (n=73) da população adulta de Kyushu, no Japão em estudo por Ihara et al., 2018. A percentagem encontra-se demonstrada por nível de intensidade de cor. A identificação dos taxa no eHOMD encontra-se entre parêntesis à direita do nome da espécie. (Adaptado de Ihara et al., 2019).

Em 2018, Takeuchi e colaboradores, analisaram o microbioma oral salivar de 70 adultos saudáveis de Yamaguchi, no Japão, com idades ≥ 20 anos, com o objetivo de verificar se o uso de xilitol seria benéfico em condições adversas nas quais estivesse impossibilitada a realização da higiene oral (Takeuchi et al., 2018). A contagem de bactérias por mL de saliva foi feita com o kit *QuantiFast SYBR Green PCR* e sistema *StepOne Real-Time PCR*. As regiões V1-V2 do ARN ribossomal 16S foram amplificadas e sequenciadas através de *Ion PGM HiQ Sequencing Kit* – método de semicondutores de iões (Takeuchi et al., 2018). A classificação taxonómica das sequências obtidas foi feita com BLAST

através de comparação com as sequências disponíveis na base de dados do microbioma oral humano (HOMD).

O grupo controlo em que se analisou a composição do microbioma sem qualquer intervenção, consistiu em 36 indivíduos e revelou os seguintes géneros por ordem decrescente de abundância relativa: *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Porphyromonas*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Leptotrichia*, *Granulicatella*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Haemophilus*, *Lautropia*, *Atopobium* e, em menor percentagem, *Abiotrophia* (**Figura 28**). Não foi mencionada variabilidade inter-indivíduo, apenas foi referido que o número de Unidades Taxonómicas Operacionais entre o grupo submetido a tratamento e o grupo controlo não teve diferenças significativas. (Takeuchi et al., 2018).

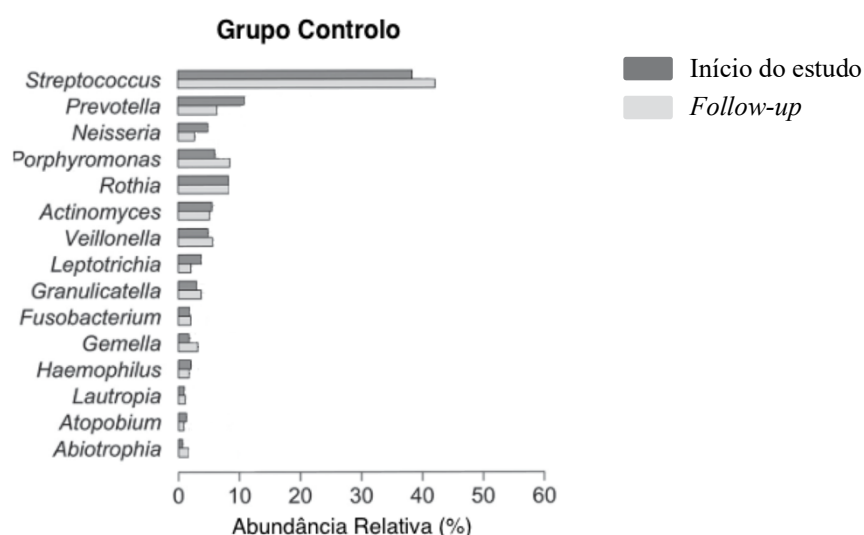


Figura 28 - Média de abundância relativa (%) de géneros bacterianos presentes nas amostras salivares de 36 indivíduos de Yamaguchi, Japão. (Adaptado de Takeuchi et al., 2018).

Shaiber e colaboradores, analisaram o microbioma oral lingual e de placa bacteriana da margem gengival numa amostra de apenas 7 indivíduos saudáveis (4 mulheres e 3 homens) com idades compreendidas entre os 21 e os 55 anos de Newton, Estados Unidos da América. O ADN extraído com *NEBNext Microbiome DNA Enrichment Kit* foi quantificado com *Picogreen*. A sequenciação dos metagenomas foi feita com recurso ao método NGS

Illumina NextSeq. Para gerar perfis taxonômicos, usou-se *KrakenUniq*, que tem capacidade de estimar abundâncias relativas dos taxa numa amostra (Shaiber et al., 2020). Nesta população, os 10 gêneros predominantes encontrados foram, por ordem decrescente de abundância relativa: *Streptococcus*, *Prevotella*, *Agreggobacter*, *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Capnocytophaga*, *Haemophilus*, *Veillonella* e *Rothia* (Shaiber et al., 2020).

Yang e colaboradores, analisaram o microbioma oral salivar de 558 euroamericanos (232 mulheres e 326 homens) com idade média de 54.72 ± 8.73 anos e 1058 afroamericanos (549 mulheres e 509 homens) com idade média de 57.95 ± 8.41 anos, residentes no sul dos Estados Unidos da América, com o objetivo de verificar se existiriam diferenças no microbioma oral consoante a etnia. A região V4 do ARN ribossomal 16S foi sequenciado com recurso à tecnologia *NGS Illumina MiSeq 300* (Yang et al., 2019).

As espécies comuns aos dois grupos étnicos diferiram em valores de abundância relativa. O grupo afroamericano revelou maior abundância de *Bacterioides* (Família *Porphyromonadaceae*, Género *Porphyromonas* e espécie *Prevotella denticola*) e menor abundância de *Actinobacteria* (Género *Rothia* e espécie *Rothia mucilaginosa*), *Firmicutes* (Género *Granulicatella*) comparativamente ao grupo euroamericano (**Tabela 6**). Nos euroamericanos, foram mais abundantes as taxas *Carnobacteriaceae*, *Granulicatella*, *Granulicatella adiacens*, *Streptococcus oligofermentans* e *Streptococcus sp. oral taxon 057*. Para além das diferenças na composição do microbioma oral no geral, 13 taxa comuns entre os dois grupos étnicos demonstraram diferenças a nível de abundância relativa entre eles (**Figura 29**) (**Tabela 6**) (Yang et al., 2019).

Tabela 6 - Abundância relativa (%) de Bacteroidetes, Actinobacteria e Firmicutes nos grupos euroamericano e afroamericano no estudo de (Yang et al., 2019).

| Taxon | Abundância relativa (%) | | | |
|----------------------------------------------|-------------------------|-----------------|--------------|-------------------------|
| | Euro americanos | Afro americanos | Coefficiente | Valor-P |
| Filo <i>Bacteroidetes</i> | | | | |
| Família <i>Porphyromonadaceae</i> | 0,19 | 0,67 | 0,38 | 0,03 |
| Gênero <i>Porphyromonas</i> | 0,18 | 0,64 | 0,37 | 0,05 |
| Espécie <i>Prevotella denticola</i> | 0,04 | 0,11 | 0,49 | 1,56 x 10 ⁻³ |
| Filo <i>Actinobacteria</i> | | | | |
| Família <i>Micrococcaceae</i> | 11,05 | 10,09 | -0,38 | 6,14 x 10 ⁻⁸ |
| Gênero <i>Rothia</i> | 5,77 | 5,47 | -0,41 | 1,81 x 10 ⁻⁶ |
| Espécie <i>Rothia Mucilaginosa</i> | 5,77 | 5,47 | -0,42 | 1,12 x 10 ⁻⁶ |
| | 4,80 | 4,65 | -0,41 | 1,21 x 10 ⁻⁵ |
| Filo <i>Firmicutes</i> | | | | |
| Família <i>Carnobacteriaceae</i> | 1,35 | 1,13 | -0,22 | 0,03 |
| Gênero <i>Granulicatella</i> | 1,32 | 1,09 | -0,24 | 0,02 |
| Espécie <i>Granulicatella adiacens</i> | 1,28 | 1,04 | -0,23 | 0,03 |
| Espécie <i>Streptococcus oligofermentans</i> | 0,46 | 0,22 | -0,42 | 7,88 x 10 ⁻⁵ |
| Espécie <i>Streptococcus sp. (057)</i> | 9,89 | 8,85 | -0,17 | 0,03 |
| Família <i>Peptostreptococcaceae</i> | 0,09 | 0,20 | 0,41 | 2,35 x 10 ⁻⁴ |

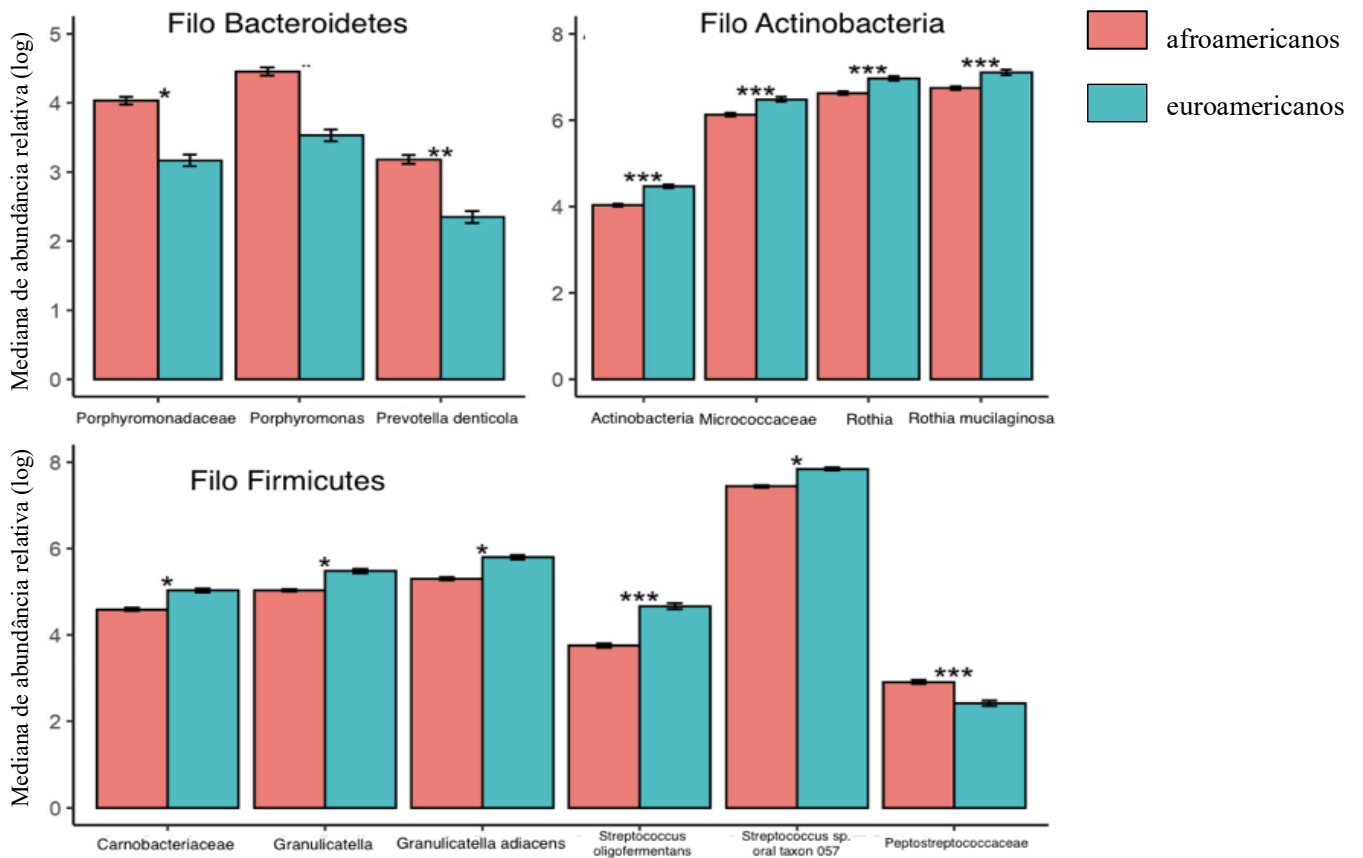


Figura 29 - Representação dos taxa em comum entre o grupo afroamericano e euroamericano e as diferenças entre a abundância relativa (%) no estudo de (Yang et al., 2019).

No total, 19 taxa demonstraram uma diferença significativa na prevalência entre os dois grupos étnicos, sendo mais prevalentes no grupo afroamericano. Entre os taxa, 4 estão associados à doença periodontal: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* e *Filifactor alocis* (**Tabela 7**) (**Figura 30**) (Yang et al., 2019).

Tabela 7 - Abundância relativa (%) de diferentes taxa nos grupos euroamericano e afroamericano no estudo de (Yang et al., 2019).

| Taxon | Abundância relativa (%) | | | |
|--------------------------------------------|-------------------------|-----------------|--------------|-------------------------|
| | Euro americanos | Afro americanos | Coefficiente | Valor-P |
| Filo <i>Bacteroidetes</i> | | | | |
| Espécie <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 57,53 | 76,09 | 0,75 | 5,23 |
| Espécie <i>Porphyromonas sp.</i> (285) | 56,45 | 71,17 | 0,53 | 8,02 |
| Espécie <i>Prevotella intermedia</i> | 61,11 | 76,09 | 0,79 | 4,47 x 10 ⁻³ |
| Espécie <i>Prevotella sp.</i> (526) | 27,78 | 50,28 | 0,70 | 3,32 |
| Filo <i>Firmicutes</i> | | | | |
| Género <i>Peptococcus</i> | 39,61 | 55,01 | 0,66 | 6,30 x 10 ⁻⁵ |
| Família <i>Peptoniphilaceae</i> | 85,84 | 92,16 | 0,77 | 0,02 |
| Espécie <i>Filifactor alocis</i> | 42,47 | 64,18 | 0,67 | 4,49 x 10 ⁻⁵ |
| Género <i>Eubacterium</i> | 31,00 | 49,72 | 0,60 | 7,08 x 10 ⁻⁴ |
| Espécie <i>Eubacterium saphenum</i> | 29,57 | 47,35 | 0,51 | 001 |
| Espécie <i>Eubacterium minutum</i> | 32,08 | 53,88 | 0,75 | 2,36 x 10 ⁻⁶ |
| Género <i>Peptostreptococcus</i> | 75,09 | 84,78 | 0,85 | 9,94 x 10 ⁻⁶ |
| Espécie <i>Peptostreptococcus stomatis</i> | 74,73 | 84,50 | 0,87 | 5,67 x 10 ⁻⁶ |
| Família <i>Erysipelotrichaceae</i> | 86,74 | 92,34 | 0,76 | 0,03 |
| Género <i>Mycoplasma</i> | 32,80 | 51,51 | 0,50 | 0,02 |
| Espécie <i>Mycoplasma faucium</i> | 32,44 | 50,76 | 0,48 | 0,03 |
| Espécie <i>Veillonella sp.</i> (780) | 69,89 | 78,07 | 0,74 | 2,31 x 10 ⁻⁴ |
| Filo <i>Spirochaetes</i> | | | | |
| Espécie <i>Treponema denticola</i> | 46,24 | 64,93 | 0,59 | 1,08 x 10 ⁻³ |
| Espécie <i>Treponema medium</i> | 42,47 | 61,91 | 0,61 | 6,32 x 10 ⁻⁴ |
| Filo <i>SRI</i> | 33,33 | 48,20 | 0,48 | 0,02 |

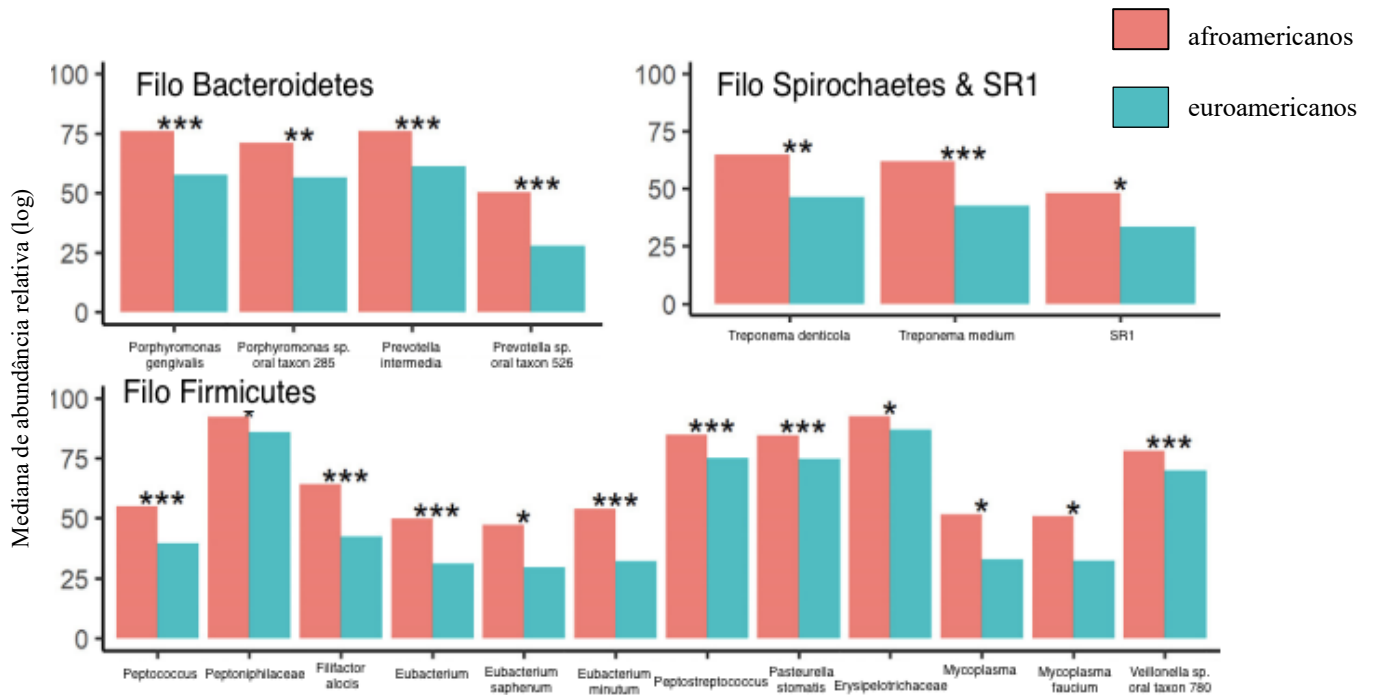


Figura 30 -- Representação dos taxa raros entre o grupo afroamericano e euroamericano e as diferenças entre a abundância relativa (%) no estudo de (Yang et al., 2019).

Em Hisayama, no Japão, 506 idosos (231 homens e 275 mulheres), com idades compreendidas entre os 70 e os 80 anos, representando mais de metade da população contida nessa faixa etária, viram o seu microbioma oral da língua analisado por Asakawa et al. (2018), através da sequenciação das regiões VI e V2 do ARN ribossomal 16S através de Ion PGM (Asakawa et al., 2018). As sequências foram alinhadas com UPARSE e a classificação taxonómica com BLAST, comparando as sequências obtidas com as sequências disponibilizadas na base de dados HOMD 16S *rRNA RefSeq* versão 14.51 da base de dados do microbioma oral humano (HOMD).

As regiões V1-V3 do ARN ribossomal 16S foram sequenciadas através do método NGS pirosequenciação e os resultados foram analisados nas plataformas MOTHUR, QUIIME e R *scripts* (Xian et al., 2018). Todas as sequências obtidas foram arquivadas no Banco de Microbioma Oral da China (OMBC). De seguida, as sequências foram alinhadas e exportadas em MEGA7. As relações filogenéticas foram feitas através do método *Neighbour-Joining*.

Por ordem decrescente de média de abundância relativa (%), foram encontradas as espécies *Streptococcus salivarius*, *Prevotella melaninogenica*, *Rothia mucilaginosa*, *Veillonella atypica*, *Neisseria flavescens*, *Prevotella histicola*, *Streptococcus parasanguinis II*, *Actinomyces odontolyticus*, *Granulicatella adiacens*, *Haemophilus parainfluenzae*, Género *Neisseria*, *Actinomyces sp.*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella pallens*, *Porphyromonas pasteri*, *Gemella sanguinis*, *Actinomyces graevenitzii*, *Sreptococcus sp.*, Género *Streptococcus*, *Leptotrichia sp.*, *Alloprevotella sp.* (**Figura 31**). Não foram mencionadas diferenças entre géneros (Asakawa et al., 2018).

| OTU | Espécies correspondentes a cada OTU (identificação HOMD) | Abundância relativa Média (%) |
|--------|----------------------------------------------------------|-------------------------------|
| OTU2 | <i>Streptococcus salivarius</i> (755) | 9.5 ± 8.6 |
| OTU4 | <i>Prevotella melaninogenica</i> (469) | 9.2 ± 6.4 |
| OTU1 | <i>Rothia mucilaginosa</i> (681) | 8.8 ± 8.1 |
| OTU9 | <i>Veillonella atypica</i> (524) | 6.0 ± 3.2 |
| OTU6 | <i>Neisseria flavescens</i> (610) | 5.8 ± 8.3 |
| OTU3 | <i>Prevotella histicola</i> (298) | 4.7 ± 6.0 |
| OTU19 | <i>Streptococcus parasanguinis II</i> (411) | 4.3 ± 3.9 |
| OTU10 | <i>Actinomyces odontolyticus</i> (701) | 3.9 ± 3.4 |
| OTU7 | <i>Granulicatella adiacens</i> (534) | 3.3 ± 2.5 |
| OTU5 | <i>Haemophilus parainfluenzae</i> (718) | 3.2 ± 4.0 |
| OTU421 | Genus <i>Neisseria</i> ' | 2.4 ± 5.1 |
| OTU25 | <i>Actinomyces sp.</i> (172) | 2.2 ± 2.9 |
| OTU8 | <i>Fusobacterium periodonticum</i> (201) | 1.8 ± 2.3 |
| OTU15 | <i>Prevotella pallens</i> (714) | 1.5 ± 1.5 |
| OTU14 | <i>Porphyromonas pasteri</i> (279) | 1.5 ± 2.7 |
| OTU11 | <i>Gemella sanguinis</i> (757) | 1.3 ± 1.3 |
| OTU23 | <i>Actinomyces graevenitzii</i> (866) | 1.3 ± 2.1 |
| OTU22 | <i>Streptococcus sp.</i> (074) | 1.3 ± 1.5 |
| OTU28 | Genus <i>Streptococcus</i> ' | 1.3 ± 1.5 |
| OTU12 | <i>Leptotrichia sp.</i> (417) | 1.1 ± 2.8 |
| OTU17 | <i>Alloprevotella sp.</i> (308) | 1.0 ± 1.4 |

Figura 31 - 21 espécies predominantes no microbioma da língua de 506 idosos estudados por (Asakawa et al., 2018). (Adaptado de Asakawa et al., 2018).

Com o objetivo de criar uma base de dados do microbioma oral característico da população Chinesa, Xian e colaboradores, recolheram amostras de 720 indivíduos de diferentes regiões da China. As amostras recolhidas incluíram saliva, placa bacteriana, mucosas e regiões orais com infeção, e analisadas através da sequenciação das regiões VI a V3 do ARN ribossomal 16S através do método NGS pirosequenciação (*Roche 454 FLX Titanium*). As amostras foram recolhidas juntamente com a histórica clínica e análises realizadas de cada indivíduo. Foram identificadas estirpes bacterianas pertencentes a famílias: *Micrococcaceae*, e *Actinomycetaceae* do Filo *Actinobacteria*; *Neisseriaceae*,

Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae e Moraxellaceae do Filo Proteobacteria e Lactobacillaceae, Streptococcaceae e Veillonellaceae do Filo Firmicutes (Xian et al., 2018).

IV. Conclusão

Na presente revisão bibliográfica, foi possível concluir que o microbioma das crianças é semelhante ao da progenitora, verificando-se a transmissão vertical do microbioma oral, bem como a presença de espécies presentes no leite materno no microbioma oral.

Foi possível associar a introdução de alimentos sólidos e a erupção dentária ao aumento de complexidade do microbioma oral das crianças, sendo necessários estudos adicionais para clarificar a influência de cada um dos fatores anteriores, uma vez que há contradição nos resultados dos estudos atuais.

A espécie *Streptococcus mutans* foi associada a um índice de cárie elevado em todos os estudos que abordaram a cárie dentária.

Na idade adulta, apesar dos géneros pertencentes ao microbioma oral serem maioritariamente comuns entre as regiões, não foi possível determinar um padrão de variação tanto por escassez de artigos publicados entre 2018 e 2021 relativamente ao tema desta revisão, como por impossibilidade de normalizar os dados recolhidos tendo em conta que nem todos os artigos atingiram o nível de espécie na sua classificação taxonómica.

Relativamente às diferenças entre o género feminino e masculino, os resultados também se revelaram díspares, havendo necessidade de mais estudos comparativos.

A nível de etnia, apenas um estudo revelou diferenças significativas entre duas regiões, tendo sido demonstrada a possibilidade de predição da região de um indivíduo com base no microbioma apresentado, acentuando a importância de aprofundar o tema em estudos futuros.

De uma forma geral, os resultados existentes não são coincidentes e, como tal, o resultado deste estudo é inconclusivo, sendo necessária a realização de estudos longitudinais mais amplos no futuro, com dados clínicos e demográficos bem definidos e uniformizados, que permitam registar as variações no microbioma oral ao longo da vida, tendo em consideração a etnia da população em estudo.

V. Bibliografia

- Asakawa, M., Takeshita, T., Furuta, M., Kageyama, S., Takeuchi, K., Hata, J., Ninomiya, T., & Yamashita, Y. (2018). *crossm.* 3(4), 1–13.
- Belstrøm, D. (2020). The salivary microbiota in health and disease. *Journal of Oral Microbiology*, 12(1). <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1723975>
- Bescos, R., Ashworth, A., Cutler, C., Brookes, Z. L., Belfield, L., Rodiles, A., Casas-Agustench, P., Farnham, G., Liddle, L., Burleigh, M., White, D., Easton, C., & Hickson, M. (2020). Effects of Chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *Scientific Reports*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61912-4>
- Bhat, G., & Jain, A. (2020). Next generation sequencing. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 41(3), 381–382. https://doi.org/10.4103/ijmpo.ijmpo_28_20
- Bruijns, B., Tiggelaar, R., & Gardeniers, H. (2018). Massively parallel sequencing techniques for forensics: A review. *Electrophoresis*, 39(21), 2642–2654. <https://doi.org/10.1002/elps.201800082>
- Burcham, Z. M., Garneau, N. L., Comstock, S. S., Tucker, R. M., Knight, R., Metcalf, J. L., Miranda, A., Reinhart, B., Meyers, D., Woltkamp, D., Boxer, E., Hutchens, J., Kim, K., Archer, M., McAteer, M., Huss, P., Defonseka, R., Stahle, S., Babu, S., ... Reusser, W. (2020). Patterns of Oral Microbiota Diversity in Adults and Children: A Crowdsourced Population Study. *Scientific Reports*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59016-0>
- Caselli, E., Fabbri, C., D'Accolti, M., Soffritti, I., Bassi, C., Mazzacane, S., & Franchi, M. (2020). Defining the oral microbiome by whole-genome sequencing and resistome analysis: The complexity of the healthy picture. *BMC Microbiology*, 20(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01801-y>
- Chaitanya, P., Reddy, J. S., Suhasini, K., Chandrika, I. H., & Praveen, D. (2018). Permanent Teeth in Hyderabad Children: A Descriptive Cross-sectional Study. *Int J Clin Pediatr Dent*, 11(4), 330–337.
- Chen, Y., Agnello, M., Dinis, M., Chien, K. C., Wang, J., Hu, W., Shi, W., He, X., & Zou, J. (2019). Lollipop containing Glycyrrhiza uralensis extract reduces Streptococcus mutans colonization and maintains oral microbial diversity in Chinese preschool children. *PLoS ONE*, 14(8), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221756>

- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), 767–775. <https://doi.org/10.1177/1040638720905833>
- Dashper, S. G., Mitchell, H. L., Lê Cao, K. A., Carpenter, L., Gussy, M. G., Calache, H., Gladman, S. L., Bulach, D. M., Hoffmann, B., Catmull, D. V., Pruilh, S., Johnson, S., Gibbs, L., Amezdroz, E., Bhatnagar, U., Seemann, T., Mnatzaganian, G., Manton, D. J., & Reynolds, E. C. (2019). Temporal development of the oral microbiome and prediction of early childhood caries. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56233-0>
- Deo, P., & Deshmukh, R. (2019). Oral Microbiome: Unveiling the fundamentals. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 21(3), 244–251. <https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP>
- Duan, H., Li, X., Mei, A., Li, P., Liu, Y., Li, X., Li, W., Wang, C., & Xie, S. (2020). *The diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in infectious diseases*. 1–13. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-18934/v1>
- Dzidic, M., Collado, M. C., Abrahamsson, T., Artacho, A., Stensson, M., Jenmalm, M. C., & Mira, A. (2018). Oral microbiome development during childhood: an ecological succession influenced by postnatal factors and associated with tooth decay. *ISME Journal*, 12(9), 2292–2306. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0204-z>
- Enck, P., & Klosterhalfen, S. (2019). Placebos and the placebo effect in drug trials. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 260, 399–431. https://doi.org/10.1007/164_2019_269
- Escapa, I. F., Chen, T., Huang, Y., Gajare, P., Dewhirst, F. E., & Lemon, K. P. (2018). New Insights into Human Nostril Microbiome from the Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD): a Resource for the Microbiome of the Human Aerodigestive Tract. *MSystems*, 3(6). <https://doi.org/10.1128/msystems.00187-18>
- Flores-Pérez, J. A., De La, F., Oliva, R., Argenes, Y., & Meneses-Garcia, A. (2019). Translational Research and Onco-Omics Applications in the Era of Cancer Personal Genomics. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1168). https://doi.org/10.1007/978-3-030-24100-1_11
- Fuks, G., Elgart, M., Amir, A., Zeisel, A., Turnbaugh, P. J., Soen, Y., & Shental, N.

- (2018). Combining 16S rRNA gene variable regions enables high-resolution microbial community profiling. *Microbiome*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0396-x>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(6), 436–456. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>
- Ihara, Y., Takeshita, T., Kageyama, S., Matsumi, R., Asakawa, M., Shibata, Y., Sugiura, Y., Ishikawa, K., Takahasi, I., & Yamashita, Y. (2019). Identification of Initial Colonizing Bacteria in Dental Plaques. *Clinical Science and Epidemiology*, 4(5), 1–11.
- Ji, F., & Sadreyev, R. I. (2018). RNA-seq: Basic Bioinformatics Analysis. *Current Protocols in Molecular Biology*, 124(1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/cpmb.68>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Kageyama, S., Asakawa, M., Takeshita, T., Ihara, Y., Kanno, S., Hara, T., Takahashi, I., & Yamashita, Y. (2019). Transition of Bacterial Diversity and Composition in Tongue Microbiota during the First Two Years of Life. *MSphere*, 4(3), 1–10. <https://doi.org/10.1128/msphere.00187-19>
- Khan, A. S., Nagar, P., Singh, P., & Bharti, M. (2020). Changes in the sequence of eruption of permanent teeth; correlation between chronological and dental age and effects of body mass index of 5–15-year-old schoolchildren. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 13(4), 368–380. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1797>
- Layeghifard, M., Hwang, D. M., & Guttman, D. S. (2018). Constructing and Analyzing Microbiome Networks in R. *Methods in Molecular Biology*, 1849, 243–266. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8728-3_16
- Li, S., Huang, S., Guo, Y., Zhang, Y., Zhang, L., Li, F., Tan, K., Lu, J., Chen, Z., Guo, Q., Tang, Y., Teng, F., & Yang, F. (2021). Geographic Variation Did Not Affect the Predictive Power of Salivary Microbiota for Caries in Children With Mixed Dentition. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.680288>
- Mason, M. R., Chambers, S., Dabdoub, S. M., Thikkurissy, S., & Kumar, P. S. (2018).

- Characterizing oral microbial communities across dentition states and colonization niches. *Microbiome*, 6(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0443-2>
- Porter, T. M., & Hajibabaei, M. (2018). Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. *Molecular Ecology*, 27(2), 313–338. <https://doi.org/10.1111/mec.14478>
- Premaraj, T. S., Vella, R., Chung, J., Lin, Q., Hunter, P., Underwood, K., Premaraj, S., & Zhou, Y. (2020). Ethnic variation of oral microbiota in children. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71422-y>
- Reddy, L., Bhattacharjee, R., Misch, E., Sokoya, M., & Ducic, Y. (2019). Dental Injuries and their Management. *Modern Pediatric Dentistry*, 1(C), 262–262. https://doi.org/10.5005/jp/books/11297_32
- Shaiber, A., Willis, A., Delmont, T., Roux, S., Chen, L.-X., Schmid, A., Yousef, M., Watson, A., Lolans, K., Esen, Ö., Lee, S., Downey, N., Morrison, H., Dewhirst, F., Mark Welch, J., & Eren, A. M. (2020). *Functional and genetic markers of niche partitioning among enigmatic members of the human oral microbiome*. 1–35. <https://doi.org/10.1101/2020.04.29.069278>
- Sharma, N., Bhatia, S., Sodhi, A. S., & Batra, N. (2018). *Oral microbiome and health*. 4(October 2017), 42–66. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.1.42>
- Sulyanto, R. M., Thompson, Z. A., Beall, C. J., Leys, E. J., & Griffen, A. L. (2019). The Predominant Oral Microbiota Is Acquired Early in an Organized Pattern. *Scientific Reports*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46923-0>
- Takeuchi, K., Asakawa, M., Hashiba, T., Takeshita, T., Saeki, Y., & Yamashita, Y. (2018). *Effects of xylitol-containing chewing gum on the oral microbiota*. 60(4), 588–594.
- Timmermans, B., Peñas, A. D. Las, Castaño, I., & Van Dijck, P. (2018). Adhesins in candida glabrata. *Journal of Fungi*, 4(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/jof4020060>
- Tribble, G. D., Angelov, N., Weltman, R., Wang, B. Y., Eswaran, S. V., Gay, I. C., Parthasarathy, K., Dao, D. H. V., Richardson, K. N., Ismail, N. M., Sharina, I. G., Hyde, E. R., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., & Bryan, N. S. (2019). Frequency of tongue cleaning impacts the human tongue microbiome composition and enterosalivary circulation of nitrate. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(MAR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00039>
- Wang, J., Dean, D. C., Hornicek, F. J., Shi, H., & Duan, Z. (2019). RNA sequencing (RNA-Seq) and its application in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 152(1),

- 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.10.002>
- Whelan, S., & Morrison, D. A. (2017). Inferring trees. *Methods in Molecular Biology*, 1525, 349–377. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6622-6_14
- Willis, J. R., Iraola-Guzmán, S., Saus, E., Ksiezopolska, E., Cozzuto, L., Bejarano, L. A., Andreu-Somavilla, N., Alloza-Trabado, M., Puig-Sola, A., Blanco, A., Broglio, E., Carolis, C., Hecht, J., Ponomarenko, J., & Gabaldón, T. (2021). Oral microbiome in down syndrome and its implications on oral health. *Journal of Oral Microbiology*, 13(1). <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1865690>
- Xian, P., Xuedong, Z., Xin, X., Yuqing, L., Yan, L., Jiyao, L., Xiaoquan, S., Shi, H., Jian, X., & Ga, L. (2018). The Oral Microbiome Bank of China. *International Journal of Oral Science*, 10(2). <https://doi.org/10.1038/s41368-018-0018-x>
- Yang, Y., Zheng, W., Cai, Q., Shrubsole, M. J., Pei, Z., Brucker, R., Steinwandel, M., Bordenstein, S. R., Li, Z., Blot, W. J., Shu, X., & Long, J. (2019). *Racial Differences in the Oral Microbiome : Data from Low-*. 4(6), 1–13.
- Zhao, H., Wang, S., & Yuan, X. (2020). Detection of Pathogenic Microbe Composition Using Next-Generation Sequencing Data. *Frontiers in Genetics*, 11(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.603093>