

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – CLÍNICA ODONTOLÓGICA
CARIOLOGIA/DENTÍSTICA**

MAURÍCIO JOSÉ SANTOS MOREIRA

**Avaliação das condições de saúde bucal e níveis de *Streptococcus mutans* na
saliva de crianças com síndrome de Down**

Porto Alegre - RS

2013

MAURÍCIO JOSÉ SANTOS MOREIRA

Linha de pesquisa

Epidemiologia, etiopatogenia e repercussão das doenças da cavidade bucal e estruturas anexas

Avaliação das condições de saúde bucal e níveis de *Streptococcus mutans* na saliva de crianças com síndrome de Down

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica - Cariologia/Dentística.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lina Naomi Hashizume

Porto Alegre - RS

2013

*Aos meus pais, José Francisco e Nelcy Moreira,
autores e referências de valores estatisticamente
significativos na construção daquilo que sou hoje como
profissional e, sobretudo, como pessoa.*

AGRADECIMENTOS

À professora Lina, minha orientadora, por todo o conhecimento que me proporcionou e por me fazer gostar cada dia mais da pesquisa acadêmica.

Às acadêmicas do curso de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Carolina Schwertner, Clarissa Stegues, Débora Grandó e Alessandra Dariva, futuras colegas de profissão, amigas e sem as quais este trabalho não seria possível de se realizar.

À Luísa Mercado, técnica do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal da UFRGS, sempre companheira, prestativa e alegre em todos os momentos.

A toda equipe do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal da UFRGS, docentes, colegas e técnicos pelo companheirismo diário.

À empresa Colgate-Palmolive® pela doação de kits de higiene bucal.

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

Às Pró-Reitorias de Pesquisa (Propesq) e Extensão (Prorext) da UFRGS pelo auxílio financeiro concedido ao estudo.

Aos pais e crianças que acreditaram e participaram deste estudo por cada sorriso que ganhei de retribuição.

À Francine Paranhos, meu amor, pelo incentivo, ajuda e companheirismo ao meu lado nestes anos.

À minha família e amigos que são a base da minha vida.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para que este estudo fosse realizado.

RESUMO

Objetivo: Avaliar as condições de saúde bucal e os níveis de *Streptococcus mutans* na saliva de crianças com síndrome de Down (SD), na cidade de Porto Alegre, RS.

Materiais e Métodos: Realizou-se um estudo observacional e transversal. A amostra foi composta por um total de 131 crianças de 6 a 12 anos de idade, sendo 60 com SD e 71 sem a síndrome, niveladas por idade e gênero. A detecção de cárie em dentes decíduos e permanentes foi realizada de acordo com os critérios da OMS. Foram registrados os índices de placa (IP) e de sangramento gengival (ISG). Informações sobre consumo de sacarose, renda familiar e hábitos de higiene oral foram obtidas por meio de entrevistas com as famílias. Amostras de saliva estimulada foram coletadas para determinar os níveis de *Streptococcus mutans*. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os testes Qui-quadrado, Mann-Whitney e t de Student. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados: A experiência de cárie na dentição decídua e permanente foi similar em ambos os grupos ($P > 0,05$). Crianças com SD tiveram significativamente menos IP e ISG comparadas às crianças sem SD ($P < 0,05$). A frequência de consumo de sacarose e a renda familiar não mostraram diferença entre os grupos ($P > 0,05$). Entretanto, em relação à escovação dentária, as crianças com SD apresentaram maior frequência comparadas às crianças sem SD ($P < 0,05$). A escovação supervisionada pelos pais ou responsáveis foi significativamente maior no grupo com SD ($P < 0,01$) e esta foi diretamente associada com menores valores de IP e ISG ($P < 0,05$). Crianças com e sem SD não diferiram quanto aos níveis de *Streptococcus mutans* na saliva ($P > 0,05$). No entanto, verificou-se uma associação entre contagens elevadas ($\geq 10^6$ UFC/mL) de *Streptococcus mutans* na saliva e crianças com cárie do grupo com SD ($P < 0,05$).

Conclusões: Crianças com SD entre 6 e 12 anos de idade apresentam experiência de cárie semelhante a crianças sem a síndrome da mesma faixa etária. IP e ISG foram menores em comparação com as crianças sem a síndrome, devido à maior supervisão dos pais ou responsáveis durante a escovação dos dentes. Crianças com SD que tinham cárie foram associadas com altas contagens de *Streptococcus mutans* na saliva.

Palavras-chave: Síndrome de Down. Cárie dentária. *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

Aim: Assess oral health status and levels of mutans streptococci in saliva of Down syndrome (DS) children in the city of Porto Alegre, Brazil.

Materials and methods: A cross-sectional and observational study was performed. The sample consisted of a total of 131 children aged 6 to 12 years old, comprising 60 with DS and 71 age and gender-matched non-DS / public school children. Caries detection in primary and permanent teeth was carried out according to WHO caries criteria. Plaque and gingival bleeding indices (PI and GBI) were recorded. Information about sugar intake, household income and oral hygiene habits were obtained by families' interviews. Stimulated whole saliva samples were collected to determine mutans streptococci levels. Statistical analyses were performed using Chi-square, Mann-Whitney and Student's t test. The significance level was 5%.

Results: Dental caries in deciduous and permanent dentition was similar in DS and non-DS children ($P > 0.05$). DS children had lower PI and GBI compared to non-DS children ($P < 0.05$). The frequency of sucrose intake and household income showed no difference between the groups ($P > 0.05$). However, concerning toothbrushing habits, DS children showed a higher toothbrushing frequency compared to non-DS children ($P < 0.05$). Supervised toothbrushing by parents or guardians was significantly higher in DS children ($P < 0.01$) and this was associated with lower values of PI and GBI ($P < 0.05$). Children with and without DS did not differ in the levels of mutans streptococci in saliva ($P > 0.05$). However, there was an association between high counts ($\geq 10^6$ CFU/mL saliva) of mutans streptococci in saliva and caries experience in DS children ($P < 0.05$).

Conclusions: DS children present similar caries experience with non-DS age matched children. PI and GBI were lower in DS children, due to they have more supervised toothbrushing by parents or guardians and higher toothbrushing frequency than non-DS children. Nevertheless when DS children had caries, they were associated with high counts of mutans streptococci in saliva.

Keywords: Down syndrome. Dental caries. *Streptococcus mutans*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	8
1.1	Histórico.....	8
1.2	Tipos de síndrome de Down.....	8
1.3	Incidência, prevalência e causas.....	9
1.4	Diagnóstico.....	10
1.5	Características.....	11
1.6	Anomalias sistêmicas.....	11
1.7	Anomalias orais.....	12
1.8	Anomalias dentárias.....	13
1.9	Cárie dentária.....	14
2.0	Doença periodontal.....	17
2.1	Contagem de <i>Streptococcus mutans</i>	18
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	20
3	ARTIGO CIENTÍFICO	21
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
	REFERÊNCIAS	40
	ANEXOS	44

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Histórico

Relatos de culturas antigas descrevendo características faciais demonstram que indivíduos com síndrome de Down fazem parte da cultura humana há milhares de anos (1, 2). Entretanto, foi apenas no século XIX que John Langdon Down, médico inglês, publicou um ensaio descrevendo o fenótipo de crianças com características comuns diferentes de outras crianças com retardo mental (3). Este trabalho acadêmico levou Down a ser reconhecido como “pai” da síndrome. Embora outras pessoas já tivessem reconhecido as características da síndrome, foi Down quem descreveu a condição como distinta e separada.

A causa da síndrome de Down permaneceu desconhecida até a metade do século XX. As descobertas de cariotipagem e a definição do exato número de cromossomos presentes no genoma humano permitiram que Lejeune e cols. (4, 5) e Jacobs e cols. (6) - de forma independente - mostrassem, em 1959, que a síndrome de Down era causada por um cromossomo extra presente no vigésimo primeiro par. Em vez dos usuais 46 cromossomos, encontram-se 47.

1.2 Tipos de síndrome de Down

Tipicamente, o núcleo de cada célula humana contém 23 pares de cromossomos, metade dos quais é proveniente de cada um dos pais. A síndrome de Down ocorre quando um indivíduo tem uma cópia extra, parcial ou total, do cromossomo 21.

Existem três tipos de síndrome de Down: trissomia do 21 (não-disjunção), translocação e mosaïcismo.

Usualmente a síndrome de Down é causada por um erro na divisão celular chamada de não-disjunção. Esta é a condição mais comum entre indivíduos com síndrome de Down, acometendo 95% dos casos (7). Nesta situação, previamente ou no ato da concepção, um cromossomo do vigésimo primeiro par falha em se separar ou no espermatozoide ou no óvulo. Como o embrião se desenvolve, o cromossomo extra é replicado em todas as células do corpo.

Os casos de mosaïcismo ocorrem quando a não-disjunção do cromossomo 21 acontece em uma - e não em todas - das divisões celulares iniciais após a

fertilização. Quando isso ocorre, há uma mistura de dois tipos de células: algumas contendo os usuais 46 cromossomos, e outras com 47. Aquelas células com 47 cromossomos contêm um cromossomo extra no vigésimo primeiro par. Os casos de mosaicismo acometem em torno de 1% dos casos de síndrome de Down (7).

Na translocação, parte do cromossomo 21 se quebra durante a divisão celular e se junta a outro cromossomo, normalmente o décimo quarto par. Nesta situação, os indivíduos permanecem com 46 pares de cromossomos, mas a presença de uma parte extra do vigésimo primeiro par em outro local leva às características da síndrome de Down. A translocação acontece em 4% dos casos (7).

1.3 Incidência, prevalência e causas

A síndrome de Down é a alteração genética mais comum em seres humanos, acometendo todas as etnias e níveis socioeconômicos. Nos Estados Unidos, um em cada 691 nascidos vivos tem síndrome de Down. Aproximadamente 400 mil americanos têm a síndrome (7). No Brasil, estima-se que nasça uma criança com síndrome de Down a cada 700 nascimentos (8). O censo não registra o número de pessoas com síndrome de Down, mas estima-se que aproximadamente 300 mil brasileiros têm esta alteração genética (9).

A causa para a não-disjunção cromossômica ainda é desconhecida, mas estudos mostram que há um aumento da frequência desta alteração com o aumento da idade materna (7). Uma mulher aos 35 anos de idade tem, aproximadamente, uma chance em 350 de ter um filho com a síndrome. Esta chance aumenta gradualmente para uma em 100 aos 40 anos, e aumenta consideravelmente para uma chance em 30 aos 45 anos de idade. Entretanto, devido à maior taxa de nascimentos em mulheres mais novas, cerca de 80% das crianças com síndrome de Down são filhos de mulheres com menos de 35 anos de idade (7).

Nenhuma pesquisa científica, até o momento, indicou que a síndrome de Down seja causada por fatores ambientais ou hábitos dos pais antes ou durante a gravidez. A cópia do cromossomo 21 (parcial ou total) que causa a síndrome de Down pode ser originária do pai ou da mãe. Entretanto, apenas 5% dos casos são provenientes do pai (7).

Os três tipos da síndrome de Down - trissomia do 21, mosaicismo e translocação - são condições genéticas, mas apenas 1% dos casos da síndrome tem componentes hereditários. A hereditariedade não é um fator de risco para

trissomia do 21 e do mosaicismo. Entretanto, um terço dos casos de síndrome de Down resultante de translocação tem componente hereditário envolvido (7).

1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da síndrome de Down pode ser realizado no pré-natal ou no nascimento da criança. A maioria dos exames envolve um teste sanguíneo e uma ultrassonografia.

No pré-natal é possível diagnosticar a síndrome por meio de três exames: translucência nucal, biópsia de vilosidades coriônicas e amniocentese.

A translucência nucal – medição da prega nucal do feto – serve como uma triagem para que, caso haja suspeita da síndrome de Down, seja feita uma confirmação laboratorial do diagnóstico. A translucência nucal é realizada por meio de uma ecografia entre a 12^a e 13^a semana de gestação. A prega de uma nuca normal mede de 2,3 a 2,6 milímetros. Se esta medida estiver maior, pode ser indício da síndrome de Down. A coleta de vilosidades coriônicas consiste na retirada de material genético da placenta (que tem material genético idêntico ao feto) para posterior exame laboratorial de cariótipo. Este exame deve ser realizado entre a 12^a e 15^a semana de gestação. A amniocentese consiste na retirada de líquido amniótico para análise. Este exame é realizado após a 15^a semana de gestação. Existe uma chance de 99% de acerto, e 1% de falha por risco de aborto resultante do procedimento (7).

Ao nascimento da criança, a síndrome de Down pode ser identificada por certas características físicas: baixo tônus muscular, uma única prega profunda na palma da mão, perfil facial ligeiramente achatado e inclinação dos olhos para cima. Uma vez que estas características podem estar presentes em crianças sem a síndrome de Down, uma análise cromossômica (cariótipo) é realizada para confirmar o diagnóstico. Para este exame, uma amostra sanguínea da criança é retirada. Os cromossomos são então agrupados de acordo com os seus tamanhos, números e formatos. O resultado do cariótipo na síndrome de Down pode resultar em trissomia do 21 (cariótipos 47, XY, +21 ou 47, XX, +21), translocação [cariótipos 46, XY, t(...,21) ou 46, XX, t(...,21)] e mosaicismo (cariótipos 46, XY/47, XY, +21 ou 46, XX/47, XX, +21)

1.5 Características

Dentre as características físicas mais comuns dos indivíduos com síndrome de Down, destacam-se a hipotonia, cabeça pequena com braquicefalia, epicanto, ponte nasal achatada, fissuras palpebrais oblíquas, manchas de Brushfield, boca e orelhas pequenas, excesso de pele na nuca, prega palmar única transversa e um quinto dedo curto com clinodactilia, muitas vezes com uma ranhura plantar profunda entre o primeiro e segundo dedos. A dificuldade cognitiva também varia bastante entre os indivíduos com síndrome de Down variando de leve, moderada ou ocasionalmente grave. Existe um significativo risco de perda de audição (75%), apneia obstrutiva do sono (50-79%), otite (50-70%), doenças oculares (60%), cardiopatias congênitas (50%), disfunção neurológica (1-13%), atresia gastrointestinal (12%), luxação do quadril (6%), doenças da tireoide (13-18%) e leucemia (1%) (10).

Os indivíduos com síndrome de Down podem apresentar dificuldade na linguagem verbal, escrita, leitura e aritmética (11). Estudos sobre os problemas de comportamento indicam que, em média, de um quarto a um terço das crianças com síndrome de Down têm significantes problemas de comportamento e emocionais (12, 13). Também podem ocorrer problemas de concentração e déficit de atenção, retraimento social, teimosia e desobediência (12).

1.6 Anomalias sistêmicas

Algumas anomalias sistêmicas de pessoas com síndrome de Down são de especial interesse para a Odontologia, tais como anomalias cardíacas, hematopoiéticas, músculo-esqueléticas e do sistema nervoso.

As anomalias cardíacas congênitas estão presentes em cerca de 40 a 50% das pessoas com síndrome de Down (10, 14). Entretanto, cirurgias durante a infância para a correção de defeitos cardíacos são, na maioria dos casos, bem sucedidas e levam a um bom prognóstico. Cuidado especial deve ser tomado em relação à profilaxia antimicrobiana, que deve ser seguida, quando indicada, segundo as diretrizes da *American Heart Association* (15).

Anomalias hematopoiéticas levam indivíduos com síndrome de Down a terem maior suscetibilidade a infecções. Entretanto, sua exata patogênese ainda é desconhecida. Infecções na pele, mucosa, gastrointestinais e respiratórias são frequentes (14). Crianças com síndrome de Down têm entre 10 e 15 vezes mais

risco de desenvolver leucemia do que crianças sem a síndrome (16). Lesões persistentes e sangramento gengival espontâneo podem ser indícios de leucemia (17). Neste sentido, a atenção do cirurgião-dentista a qualquer manifestação bucal é de suma importância.

Uma alteração músculo-esquelética comum em indivíduos com síndrome de Down é o pouco desenvolvimento do terço médio da face, levando ao prognatismo (17). A passagem de ar pelo nariz é usualmente estreita e parcialmente obstruída, resultado de desvio de septo e espessamento da mucosa. Isso leva frequentemente à respiração bucal. A boca mantida aberta para respirar faz com que a língua seja empurrada para entre os lábios (17).

Pessoas com síndrome de Down usualmente têm sua função motora deficiente, mas a coordenação aumenta com a idade (17). Assim, torna-se importante o cuidado de um responsável ao realizar a higiene bucal do indivíduo com síndrome de Down até que ele tenha condições suficientes para realizá-la sozinho.

Aproximadamente 30% das pessoas com síndrome de Down são afetadas pela demência (17). Após os 35 anos de idade, muitas desenvolvem mudanças neuropáticas análogas àquelas encontradas na doença de Alzheimer (16). Indivíduos com síndrome de Down exibem uma ampla variedade de deficiência mental, variando de quase normal até um retardo severo (16).

1.7 Anomalias orais

Alterações estomatognáticas são comuns em indivíduos com síndrome de Down.

O terço médio da face pode ser hipoplásico em relação à mandíbula, o que resulta em diminuição do comprimento, altura e profundidade do palato, enquanto que a largura não é afetada (17). Uma significativa redução do comprimento do palato leva a uma aparência ogival.

A reduzida cavidade bucal leva a língua a tentar se posicionar entre os lábios. Como consequência, a boca dos indivíduos com síndrome de Down tende a ficar aberta. Assim, a respiração bucal é um achado frequente, aumentando também o risco de infecções do trato respiratório (16). A saliva que se acumula na comissura bucal por esse processo provoca maior tendência de desenvolvimento de queilite angular (17).

A língua de pessoas com síndrome de Down tem tendência de ser fissurada, dificultando a higienização e podendo causar halitose. A protusão da língua enquanto a pessoa bebe, come ou fala também é frequente. A pequena cavidade bucal dá a impressão de uma macroglossia, porém uma verdadeira macroglossia raramente acontece (17).

A má-oclusão é um achado frequente, principalmente mordida aberta anterior e mordida cruzada posterior (17). O bruxismo é um hábito parafuncional bastante encontrado, mesmo em crianças (18).

1.8 Anomalias dentárias

Pessoas com síndrome de Down podem apresentar algumas anomalias dentárias importantes que devem ser conhecidas pelo cirurgião-dentista para que seja feito o correto acompanhamento destes pacientes. Estima-se que 95% dos pacientes com síndrome de Down tenham pelo menos uma anomalia dentária (19).

A microdontia acontece em 35 a 55% das pessoas com síndrome de Down, tanto na dentição decídua quanto na permanente (17). O reduzido tamanho dos dentes pode levar a diastemas, muito comum nesses indivíduos. Embora menores, a anatomia da coroa exibe pouca ou nenhuma diferença quando comparada a pessoas sem a síndrome, tanto em crianças quanto em adultos (20).

Defeitos hipoplásicos nos dentes podem acontecer como resultado de enfermidades ou prolongadas febres (17). Estudos epidemiológicos têm apontado uma relação entre a presença de hipoplasia e opacidade demarcada como um risco aumentado de desenvolver cárie (21). Os defeitos de esmalte podem ser importantes indicadores de risco à cárie porque a ultra-estrutura do esmalte, que provavelmente é anormal, torna-se mais suscetível à desmineralização (22).

Manchas causadas por tetraciclina podem ocorrer como resultado do uso prolongado deste antibiótico no início da vida.

Anodontia parcial é muito comum entre pessoas com síndrome de Down, sendo que 50% destes indivíduos são afetados (17). Os dentes mais afetados, em ordem decrescente são os terceiros molares, segundos pré-molares inferiores, incisivos laterais superiores e incisivos centrais inferiores (17).

Agenesia é bastante frequente em pessoas com síndrome de Down, sendo 10 vezes mais prevalente do que na população em geral. Acontece com maior frequência em homens do que em mulheres, na mandíbula do que na maxila e do

lado esquerdo do que no direito (20). Os dentes mais frequentemente afetados por agenesia são os incisivos centrais inferiores, seguidos pelos incisivos laterais superiores, segundos pré-molares superiores e segundos pré-molares inferiores (20).

A erupção dentária pode ser atrasada nas pessoas com síndrome de Down, tanto nos dentes decíduos quanto nos permanentes. Nos decíduos, por exemplo, a erupção dos primeiros dentes (incisivos centrais inferiores) pode ocorrer na idade de 12 a 14 meses, mas pode acontecer apenas aos 24 meses de idade da criança (23). Já nos dentes permanentes, a erupção dos incisivos centrais inferiores e primeiros molares pode acontecer quando a criança estiver com 8 a 9 anos (24). Também é frequente a erupção de dentes permanentes sem a esfoliação do decíduo, principalmente nas regiões anterior superior e inferior (17). A sequência de erupção dentária não varia de forma significativa entre pessoas com e sem síndrome de Down, tanto em decíduos quanto em permanentes (23, 24).

Outras anomalias dentárias encontradas em pessoas com síndrome de Down são o taurodontismo, dentes cônicos, dilacerações radiculares e dentes impactados (19).

1.9 Cárie dentária

Muitos estudos relatam que pessoas com síndrome de Down (SD) têm menor prevalência de cárie quando comparadas a indivíduos sem a síndrome (25-31). Entretanto, muitos destes estudos apresentam pequeno número amostral, ausência de um grupo controle adequado, grande amplitude na faixa etária dos participantes ou mesmo ausência de análises estatísticas.

Barnett e cols. (25) examinaram 30 pacientes com SD com média de idade de 27,4 anos e verificaram menor prevalência de cárie em dentes permanentes nestes indivíduos, comparados com adultos de mesma faixa etária sem a síndrome. Os autores dividiram lesões em superfície oclusal e proximais e atribuíram a menor prevalência de cárie em adultos com SD ao menor índice de cárie em superfícies proximais. Sete indivíduos no grupo com SD foram considerados livres de cárie, e apenas um no grupo controle. Além do baixo número amostral, este estudo não faz nenhuma análise estatística ao considerar a diferença entre os grupos.

Stabholz e cols. (26) encontram menor prevalência de cárie em crianças com SD de 8 a 13 anos. A média do número de superfícies de dentes permanentes

cariadas, perdidas e obturadas (CPO-S) para as 32 crianças com SD examinadas foi de 1,2 ($\pm 4,0$) significativamente menor do que os outros dois grupos de comparação (um grupo de crianças sem anomalias e outro com retardo mental). Ao desmembrar o CPO-S das crianças com SD, este estudo mostra que o componente “C” (cariado) é o mais alto, evidenciando a falta de acesso ao serviço odontológico, ou mesmo a dificuldade de se realizar o tratamento nestes indivíduos. Além do baixo número amostral deste estudo, todas as crianças com SD eram institucionalizadas, diferentemente das crianças sem a síndrome que eram provenientes de uma escola da região. Vigild (32) mostra em seu estudo que pessoas com SD que vivem em instituição têm, significativamente, menor propensão a desenvolver lesões de cárie do que indivíduos com SD que vivem em suas casas, provavelmente devido às diferenças ambientais.

Morinushi e cols. (31) avaliaram 75 crianças com SD entre 2 e 18 anos de idade. Os autores mostram uma taxa de 46% de crianças livres de cárie. A polarização da cárie foi mostrada neste estudo, categorizando os indivíduos como tendo lesões leves ou graves. O trabalho destes autores, entretanto, não tem um grupo controle de comparação, e baseiam a prevalência de cárie em estudos epidemiológicos prévios.

Cogulu e cols. (27) encontraram menor prevalência de cárie em 75 crianças de 7 a 12 anos com SD comparadas a crianças da mesma faixa etária sem a síndrome. Os autores atribuem esta diferença a maior quantidade de IgA salivar encontrada nas crianças com SD. Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos no índice de placa, hábitos de escovação, frequência diária de exposição à sacarose, renda familiar, nível de educação dos pais, pH salivar, capacidade tampão e fluxo salivar.

Davidovich e cols. (28) avaliaram 70 crianças com SD com uma média de 4 anos de idade e encontraram nelas menor prevalência de cárie tanto em dentes decíduos quanto em permanentes quando comparadas a crianças sem a síndrome. Entretanto, o grupo controle deste trabalho foi composto por 32 crianças com média de idade de 9 anos e que estavam sendo atendidas no Departamento de Pediatria da Universidade de Hadassah, Israel. Além do fato de a idade desempenhar um papel fundamental no aparecimento e progressão de lesões de cárie, espera-se que crianças que estejam sendo atendidas em um centro de saúde tenham mais doenças e, assim, a escolha deste grupo controle não foi adequada. Este estudo

mostrou que a síndrome de Down pode se manifestar sobre a composição das glândulas salivares, modificando o ambiente de eletrólitos na saliva.

Areias e cols. (29) encontraram menor prevalência de cárie em crianças e adolescentes (6 a 18 anos) com SD quando comparados a seus irmãos sem síndrome. Os autores atribuíram esta diferença ao menor número de *Streptococcus mutans* encontrado na saliva das crianças com SD. Este estudo ainda encontrou um menor fluxo salivar nas crianças com SD, o que poderia aumentar a suscetibilidade dessa população à carie, mostrando que outros fatores devem favorecer estas crianças com um efeito protetor contra a doença. Os autores não encontraram, ainda, diferença na quantidade de IgA e no pH salivar. Em um trabalho pregresso, Areias e cols. (18) justificam a menor prevalência de cárie da mesma amostra por meio de resultados obtidos em questionário, mostrando que os pais de pessoas com SD levam a criança especial mais precocemente ao dentista (antes dos 5 anos de idade) denotando maior atenção dos responsáveis à saúde bucal destas crianças quando comparadas a seus irmãos. O bruxismo e a erupção tardia dos dentes também foram achados significativos nas crianças com SD.

Macho e cols. (30), ao examinarem 138 pessoas com SD e 86 irmãos sem a síndrome entre 2 e 26 anos de idade, encontraram 72% de indivíduos livres de cárie no grupo com SD, enquanto apenas 46% dos irmãos não apresentaram a doença. Ao separar em grupos de idades, ainda foi encontrada uma diferença significativa ao comparar indivíduos de 6 a 12 anos e de 13 a 26 anos, sempre aqueles com SD apresentando menor índice de cárie.

Autores formulam hipóteses para explicar a menor prevalência de cárie encontrada em alguns estudos, mas os resultados entre os trabalhos são conflitantes. Desta forma, a exata patogênese da menor prevalência de cárie em pessoas com SD permanece desconhecida. Ainda, outros trabalhos não mostram diferença na prevalência de cárie de pessoas com e sem a síndrome de Down (33-36).

Fung e cols. (31) examinaram 44 indivíduos com SD e 84 sem a síndrome entre 4 e 36 anos, e não encontraram diferença na prevalência de cárie entre os grupos. Os autores mostraram que a maioria dos estudos não controla o fato de que pessoas com SD têm menor quantidade de dentes, seja por atraso na erupção, seja por hipodontia, e isto é que leva a menor prevalência de cárie encontrada. Neste estudo, quando se ajustou o número de dentes permanentes cariados, perdidos e

obturados (CPO-D) em relação ao número de dentes presentes, não foi encontrada diferença significativa na prevalência de cárie entre pessoas com e sem SD.

Ulseth e cols. (32) não encontraram diferença na prevalência de cárie entre 30 adultos com SD institucionalizados comparados com adultos da mesma instituição com retardo mental.

Mathias e cols. (33) examinaram crianças entre 1 e 7 anos de idade, sendo 69 com SD e 69 sem a síndrome e também não encontraram diferença na prevalência de cárie entre os grupos.

Oredugba e cols. (34) não encontraram diferença na prevalência de cárie entre 43 pessoas com SD institucionalizadas e 43 sem a síndrome com uma média de 14 anos de idade. Este estudo ainda mostrou que a higiene bucal é similar entre crianças com e sem SD, mas acaba se deteriorando com a idade no grupo com SD.

2.0 Doença periodontal

Pessoas com SD têm maior risco de desenvolver doença periodontal do que pessoas sem a síndrome (17, 25, 26, 37). Estudos mostram que adultos com SD têm mais biofilme dental e gengivite do que aqueles sem a síndrome (28, 38). A doença periodontal começa em uma idade relativamente jovem, muitas vezes envolvendo a dentição decídua (37).

A predisposição a infecções sistêmicas de pessoas com SD e a composição da microbiota subgengival também têm sido investigadas e, talvez, possam justificar a suscetibilidade à doença periodontal, uma vez que esta tem caráter inflamatório (39-41).

Mathias e cols. (35) mostram em seu estudo que, mesmo com menor índice de placa, crianças com SD de 1 a 7 anos de idade apresentaram sangramento gengival maior que o grupo controle composto por crianças da mesma faixa etária sem a síndrome.

Stabholz e cols. (26) avaliaram as necessidades de tratamento periodontal em crianças de 8 a 13 anos e verificaram que não houve diferença significativa entre as crianças com e sem SD. Os mesmo autores, em um trabalho com adultos de 20 a 48 anos de idade, mostraram maior necessidade de tratamento em adultos com SD do que nos indivíduos sem a síndrome (38).

Davidovich e cols. (26) encontraram altos índices de placa e de sangramento gengival em crianças com SD comparadas a crianças sem a síndrome. Os autores

atribuem estes índices mais elevados à dificuldade dos cuidadores em realizar a higiene bucal destas crianças.

O índice de placa permite reconhecer as limitações em relação à escovação dentária. Já o índice de sangramento gengival avalia a quantidade de sítios inflamados na gengiva marginal, independente da quantidade de biofilme dental encontrado no momento do exame. Avaliar estes índices é importante para que se possa estudar as condições de saúde bucal dos indivíduos de maneira mais completa.

2.1 Contagem de *Streptococcus mutans*

Apesar de o conhecimento atual sobre a multifatorialidade da cárie permitir que se conclua que nenhum microrganismo ou grupo de microrganismos deva ser responsabilizado inteiramente pelo início e progressão da cárie, diversos estudos mostram que existe uma associação entre altas contagens de *Streptococcus mutans* e o aparecimento de lesões de cárie.

Alguns autores mostraram em seu estudo que 71% das fissuras de dentes cariados de crianças com menos de 10 anos de idade tinham contagens viáveis de *Streptococcus mutans* maior do que 10% do total cultivável da microbiota da placa, enquanto que 70% das fissuras que estavam livres de cárie não possuíam *Streptococcus mutans* detectáveis (42). Outros autores confirmaram que existe uma significativa correlação entre a prevalência de cárie e a quantidade de *Streptococcus mutans* presentes na saliva (43).

Posteriormente, outro estudo avaliou a correlação dos níveis de infecção por *Streptococcus mutans* com incidência de cárie e verificou que as crianças com um valor médio maior do que 10^6 *Streptococcus mutans* por mL de saliva mostraram uma atividade de cárie consideravelmente maior do que aquelas crianças com níveis mais baixos (44).

Outro estudo mostrou que, tanto nas fissuras quanto nas superfícies livres dos primeiros pré-molares permanentes de crianças de 7 e 8 anos de idade, apresentaram desmineralização sem cavitação quando fortemente colonizadas por *Streptococcus mutans* de 12 a 18 meses antes do diagnóstico clínico da lesão. Algumas lesões remineralizaram e os níveis de *Streptococcus mutans* caíram de forma significativa. O trabalho ainda mostrou que fissuras com níveis elevados de

Streptococcus mutans podem não apresentar lesões, enquanto que outros sítios cariados não possuíam *Streptococcus mutans* em nenhum momento (45).

Poucos estudos abordaram a contagem de *Streptococcus mutans* na saliva de pessoas com síndrome de Down, e estes relatos também apresentam resultados controversos.

Areias e cols. (29) encontraram significativamente menos quantidade de *Streptococcus mutans* na saliva estimulada de crianças de 6 a 18 anos quando comparadas com seus irmãos sem a síndrome.

Stabholz e cols. (26), embora tenham encontrado contagem numericamente menor de *Streptococcus mutans* na saliva não estimulada de crianças de 8 a 13 anos com SD, quando comparadas a crianças sem anomalias, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Contudo, crianças com retardo mental apresentaram significativamente maior quantidade de *Streptococcus mutans* na saliva do que o grupo de crianças com SD e sem anomalias.

Mathias e cols. (35) verificaram as contagens de *Streptococcus mutans* na saliva não estimulada de crianças de 1 a 7 anos com SD comparadas com crianças da mesma faixa etária sem a síndrome. Ao categorizá-las como tendo baixas, médias ou altas contagens de *Streptococcus mutans*, verificaram que, significativamente mais crianças com SD tinham contagens classificadas como altas (acima de 10^6 UFC/mL). Por meio de regressão logística observaram que estas crianças apresentavam maior risco de desenvolvimento de lesões de cárie do que aquelas com contagens médias e baixas.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

Estudos que avaliaram as condições de saúde bucal de indivíduos com síndrome de Down são numerosos, mas apresentam resultados conflitantes. Muitos destes apresentam pequeno tamanho da amostra, falta de um grupo controle adequado, grande amplitude na faixa etária dos participantes ou ausência de análises estatísticas. Alguns autores afirmam que indivíduos com síndrome de Down têm menor prevalência de cárie do que aqueles sem a síndrome. Entretanto, alguns estudos não mostram essa diferença.

Hipóteses para explicar a baixa prevalência de cárie em pessoas com síndrome de Down são formuladas, mas os resultados também são controversos. Enquanto alguns autores encontraram baixa quantidade de *Streptococcus mutans* na saliva de pessoas com SD, justificando, assim, a baixa prevalência de cárie nestes indivíduos encontrada no mesmo estudo, outros autores mostraram iguais ou até maiores quantidades destes microrganismos na saliva de pessoas com SD. Faltam estudos com delineamento, número amostral e controles adequados que possam elucidar estas controvérsias da literatura.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar as condições de saúde bucal e os níveis salivares de *Streptococcus mutans* de crianças entre 6 e 12 anos de idade com síndrome de Down, residentes na cidade de Porto Alegre, RS, comparando com crianças da mesma faixa etária sem a síndrome de Down.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Esta dissertação será apresentada na forma de um artigo científico.

**Oral health status and salivary levels of mutans streptococci in children with
Down syndrome**

Authors: Maurício J.S. Moreira, Carolina Schwertner, Clarissa G. Stegues, Débora Grando, Lina N. Hashizume

Department of Preventive and Social Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

(This manuscript will be submitted to the International Journal of Paediatric Dentistry)

Abstract

Background. There is a controversy in the literature about oral health status in individuals with Down syndrome (DS) regarding the prevalence of caries and mutans streptococci counts in saliva.

Aim. Assess the oral health status and levels of mutans streptococci in saliva of DS children in the city of Porto Alegre, Brazil.

Design. A cross-sectional and observational study was performed. The sample consisted of a total of 131 children aged 6 to 12 years old, comprising 60 with DS and 71 age and gender-matched non-DS / public school children. Caries detection in primary and permanent teeth was carried out according to WHO caries criteria. Plaque and gingival bleeding indices (PI and GBI) were recorded. Information about sugar intake, household income and oral hygiene habits were obtained by families' interviews. Stimulated whole saliva samples were collected to determine mutans streptococci levels. Statistical analyses were performed using Chi-square, Mann-Whitney and Student's t test. The significance level was 5%.

Results. Dental caries in deciduous and permanent dentition was similar in DS and non-DS children ($P > 0.05$). DS children had lower PI and GBI compared to non-DS children ($P < 0.05$). The frequency of sucrose intake and household income showed no difference between the groups ($P > 0.05$). However, concerning toothbrushing habits, DS children showed a higher toothbrushing frequency compared to non-DS children ($P < 0.05$). Supervised toothbrushing by parents or guardians was significantly higher in DS children ($P < 0.01$) and this was associated with lower values of PI and GBI ($P < 0.05$). Children with and without DS did not differ in the levels of mutans streptococci in saliva ($P > 0.05$). However, there was an association between high counts ($\geq 10^6$ CFU/mL saliva) of mutans streptococci in saliva and caries experience in DS children ($P < 0.05$).

Conclusions. DS children present similar caries experience with non-DS age matched children. PI and GBI were lower in DS children, due to they have more supervised toothbrushing by parents or guardians and higher toothbrushing frequency than non-DS children. Nevertheless when DS children had caries, they were associated with high counts of mutans streptococci in saliva.

Introduction

Down syndrome (DS) is the most common genetic disorder in humans. The incidence of this anomaly is 1 in 600 to 1 in 1000 live births¹. Increased maternal age above 35 years plays an important role in the incidence of DS².

DS individuals have some peculiar aspects of the oral cavity that must be known for proper monitoring of these people. These aspects include frequent malocclusions, temporomandibular joint dysfunction, malalignment and bruxism^{3,4}. High palate with “v” shaped, angle of the mouth pulled down, lower lip everted, mouth breathing with drooling, chapped lower lip and angular cheilitis are frequent findings². The tongue may be scalloped, fissured and protruded. Macroglossia is relative to the small oral cavity and is rarely a true macroglossia². In relation to dental anomalies, microdontia, hypodontia, partial anodontia, supranumerary teeth, diastema, agenesis and delayed eruption are common^{2,3}. Some dental morphological anomalies may be protective against caries formation, like delayed eruption and small size of the tooth due the microdontia.

Many studies claim that individuals with DS have lower prevalence of caries when compared to individuals without the syndrome^{3,5-10}. Furthermore, other studies did not show difference in caries prevalence of individuals with and without DS¹¹⁻¹⁴. The reasons for these conflicting results may be attributed to study design or analysis as small sample sizes^{8,9}, wide range in age of participants¹⁴ or absence of adequate control group^{6,10}. The experience of caries also should be analyzed together with factors such as diet and oral hygiene habits.

Authors have also reported a high correlation between caries prevalence and mutans streptococci counts in saliva¹⁵. Some studies with DS individuals have found conflicting results when investigate the salivary levels of this microorganism in these individuals. While some authors found lower salivary counts of mutans streptococci in DS children compared to their non-DS siblings¹⁶, other authors found no difference in scores of mutans streptococci between individuals with and without DS⁸. Still, another study found higher mutans streptococci counts in saliva in DS children compared to non-DS children¹³.

DS individuals have an increased risk for the development of periodontal disease^{2,8,9,17}. Studies have showed that adults with DS have more plaque and gingivitis than those without the syndrome^{6,8}. It was found that DS children, with

supervised toothbrushing by parents or guardians and even with a lower plaque index, have presented early periodontal disease¹³. The factors that may influence directly the periodontal disease should be assessed because they are important due the high prevalence of periodontal disease in DS individuals¹⁸.

There is no consensus in the literature about oral health status in DS individuals. Although studies are numerous, the results are controversial. There is a lack of well-designed studies that elucidate this issue. Thus, the aim of this investigation was to determine the oral health status and the levels of mutans streptococci in saliva of children with Down syndrome aged between 6 and 12 years compared with a matched non-DS control group.

Materials and methods

Ethical considerations

Approval was obtained from the Ethical Committee of the Clinics Hospital of Porto Alegre, RS, Brazil (protocol number 23211). All parents/legal guardians of the participants of this study signed an informed consent document according to the Declaration of Helsinki of 2008¹⁹. After performing the clinical examinations, parents or guardians were informed about the oral health needs of their children and referred for treatment, when necessary, in the Faculty of Dentistry at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Study design and sample

A cross-sectional and observational study was performed. Calculating the sample size was based on a study of Areias et al.¹⁶, considering the DMFT as the main outcome. Adopting a statistic power of 0.8 and a level of significance of 0.05, it has reached the number of 51 participants in each group. Expecting a sample loss, the number of participants was increased by 15%.

The sample included 131 children aged between 6 and 12 years old. The case group was composed of 60 children with cytogenetic confirmation of DS who were enrolled in the genetic medical service of Clinics Hospital of Porto Alegre, Brazil. A total of 244 DS children between 6 and 12 years old were identified. Of these, those who live in the Porto Alegre were considered eligible (149 children). Contact was

made by phone with parents or guardians and those who agreed to participate in the study had a scheduled visit, totaling 60 DS children.

The control group consisted of 71 children without DS selected among students from a public elementary school in Porto Alegre. All the 102 school children between 6 and 12 years old were invited to participate in the study, but only 71 gave the informed consent document authorizing the exams.

None of the children in either group had any systemic diseases and they had not taken antibiotics for at least 2 months prior the study. The exclusion criteria were failure to perform clinical examination due to lack of cooperation of the child and use orthodontic appliances. One child in the group of non-DS was excluded by using orthodontic appliances and also just a child with DS was excluded for not allowing the clinical examination.

Information about household income, sugar intake and oral hygiene habits were obtained by interviews by phone with parents or guardians.

Clinical examination

The clinical examination was performed by a single well-trained examiner (MJSM) while the subjects were seated in a chair. Prior to the study, calibration sessions were held. Twenty children were examined twice with a week interval between the clinical examinations at the beginning of the study to calculate their subsequent agreement. Intra-examiner agreement for clinical examination was 0.96, which is deemed excellent according to a standard interpretation of kappa.

The plaque index (PI) was the first clinical examination e was recorded as presence or absence of dental biofilm visible without the use of a probe²⁰.

The gingival bleeding index (GBI) was performed exactly after running the PI. It was found bleeding on probing, inserting the probe 1-2 mm intrasulcular and traversing the gingival margin from distal to mesial. It was registered presence or absence of bleeding gingival margin²⁰.

After, the dental biofilm was removed professionally for the diagnosis of caries. This clinical examination was based on visual-tactile criteria using a sterile dental mirror and a blunt dental probe, assisted by artificial light. Diagnosis of caries was based on the detection of carious lesions at the cavitation stage, in accordance with

the criteria recommended by WHO²¹ and documented decayed, missing and filled teeth for primary teeth (dmft) and permanent teeth (DMFT).

Collection of saliva samples and microbiological procedures

Each participant was instructed not to eat or drink anything for 2 h before sample collection. Stimulated saliva samples were collected by asking the subjects to chew an unflavored, sugar-free gum. Children without the reflex to spit had no saliva collected. All samples were kept at 4°C and processed within 3 h.

The saliva samples were vortexed for 10 s (Phoenix AP56, Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, Brazil) and serially diluted in sterile saline solution. Aliquots of 25 µL from each dilution were placed in duplicate on Mitis salivarius bacitracin agar (Difco, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) for mutans streptococci quantification. The plates were incubated microaerophilically at 37°C for 48 h. Mutans streptococci were identified on the basis of colony morphology and confirmed with biochemical tests²².

The microbiological counts were expressed as colony forming units per milliliter of saliva (CFU/mL). All counts were blindly performed by the same researcher. The counts were classified as low ($\leq 10^5$ CFU/mL), medium (10^5 - 10^6 CFU/mL) or high ($\geq 10^6$ CFU/mL)²³.

Data analysis

The categorical variables were described using absolute frequencies (%). Normality of the data was tested using Shapiro-Wilk test. The continuous variables were described using median, minimum and maximum when the distribution was asymmetric. The symmetric distribution was described using mean and standard deviation. Mann-Whitney *U* test was used in the first case and Student *t* test for the second case. To assess the association between continuous and categorical variables, Chi-square test was used. A level of 0.05 was considered as significant. The analyses were performed using SPSS version 18.0 (IBM, Chicago, IL, USA).

Results

The variables gender, age, daily frequency of sucrose intake and household income were similar between DS and non-DS children. Daily frequency of toothbrushing and supervised toothbrushing by parents or guardians were variables that showed significant difference between the groups (Table 1).

The clinical variables evaluated at both groups are showed in the Table 2. PI and GBI were lower in the children with DS compared to non-DS children ($P < 0.05$).

Experience of dental caries for primary and permanent dentitions was similar in both groups ($P > 0.05$). The means (\pm SD) of DMFT and dmft were 0.46 (\pm 1.17) and 2.25 (\pm 4.54) for DS children, and 0.58 (\pm 1.00) and 1.87 (\pm 3.04) for non-DS children, respectively ($P > 0.05$).

There was no difference between the percentage of caries-free between the two groups ($P > 0.05$).

When comparing the numbers of teeth in each group, DS children had significantly more primary teeth ($P < 0.05$) and less permanent teeth ($P < 0.01$) than the non-DS control group even though the mean age similar in both groups.

The salivary levels of mutans streptococci were not statistically different between the groups ($P > 0.05$). Children with DS had a mean (\pm SD) of 6.08 (\pm 6.38) log CFU/mL saliva whereas non-DS children had 5.48 (\pm 5.67) log CFU/mL saliva. Table 3 shows the frequency of children in each category of salivary counts of mutans streptococci (low, medium and high). Significant difference was observed for medium and high counts between the groups. The medium counts (10^5 - 10^6 CFU/mL saliva) were more frequent in the non-DS group and high counts ($\geq 10^6$ CFU/mL saliva) were more frequent in the DS group. No difference was observed in the low counts ($\leq 10^5$ CFU/mL) of mutans streptococci in saliva.

Each group (DS and non-DS children) was divided in children with caries experience (CC) when the DMFT or dmft was ≥ 1 and caries-free children (CF) when the DMFT and dmft was zero. Association between caries experience and each category of salivary mutans streptococci count is showed in Table 4. High counts of mutans streptococci ($\geq 10^6$ CFU/mL saliva) were associated directly with the CC in DS group and medium counts (10^5 - 10^6 CFU /mL saliva) were associated directly with CC in non-DS children.

When the association between supervised toothbrushing by parents /guardians and PI or GBI was verified, it was found significant difference. Children with supervised toothbrushing by a parents/guardians, in both groups, had a significant direct association with lower PI ($P = 0.016$) and GBI ($P = 0.009$).

Discussion

The knowledge about the oral health status in a population is important to establish preventive and therapeutic strategies. Studies about oral health status in DS individuals are numerous in the literature, but have controversial results. Therefore, this study aimed to determine the oral health status of DS children aged 6-12 years old, through a controlled study with an appropriate design. Caries experience in primary and permanent dentition, plaque and gingival bleeding indices, salivary counts of mutans streptococci and toothbrushing habits were analyzed in this study.

The results of this study showed no difference in caries prevalence of children with and without DS in both primary and permanent teeth. Although this study has found a higher percentage of caries-free children in the group with DS, statistical difference between the groups was not shown. Other studies did not show any difference in caries prevalence between individuals with and without DS¹¹⁻¹⁴. The results of this study do not agree with some authors that have found lower rates of caries in children with DS^{3,5,7}. One of the possible reasons for the variability in the results of different studies with DS individuals is the use of inconsistent research methods. Some studies used small samples⁸, few matched subjects with DS¹¹, wide age range of participants¹⁴, lack of an adequate control group^{6,10} or absence of appropriate statistical analysis⁹.

Others studies also have found lower caries prevalence in individuals with DS. However, they showed some methodological flaws. Barnett et al.⁹, after examining 30 individuals with and 30 without DS, found seven individuals with DS caries-free, and only one in the control group. Besides the low sample size, this study did not perform statistical analysis by considering the difference between the groups. Stabholz et al.⁸ found a lower prevalence of caries in 32 children with DS aged 8 to 13 years institutionalized compared to children non-institutionalized without the syndrome. In addition to the small sample size, a study²⁴ shows that institutionalized individuals

with DS have less caries index than non-institutionalized by the difference in the environment where they live. Morinushi et al.¹⁰ evaluated 75 DS individuals aged between 2 to 18 years. The authors have showed a 46% rate of caries-free. However, there was no control group for comparison.

One explanation for the majority of studies to show a lower caries prevalence in DS children may be the number of erupted teeth. The present study observed that DS children have significantly less permanent teeth and more deciduous teeth than in the group without DS, although both groups had the same average age. This difference may be due to delayed eruption of permanent teeth that is characteristic in DS people. Those studies that found lower prevalence of caries in DS persons do not control this variable. Although some studies working with children at the age of mixed dentition, some of them only the DMFT or DMFS (permanent teeth) was considered^{7,8}. Thus, it can be expected that DS children, by having fewer permanent teeth, have lower DMFT. A study that set the ratio of the number of teeth in people with and without SD also found no significant difference in caries prevalence between groups¹¹.

The results of this study showed that DS children aged 6 and 12 years old have fewer dental biofilm and less gingivitis than children without this syndrome. It was shown that the DS children had significantly more help of parents or guardians while brushing teeth. When this variable was associated with the PI and GBI, it was found that there was a significant difference between children who had or not supervised toothbrushing by parents or guardians. Children with supervised toothbrushing by parents or guardians had lower plaque and gingival bleeding indices. Other authors have demonstrated that the supervised mechanical removal of dental biofilm is essential for the reduction of the plaque index and thus reduce gingival bleeding in DS children²⁵. Other studies have found higher plaque and gingival bleeding indices in people with DS^{6,26}. Shapira et al.²⁶ found significantly higher periodontal treatment needs among adults with DS compared with non-DS individuals. Whereas, Davidovich et al.⁶ found more gingival bleeding in DS children with caries than non-DS children with caries. Although factors such low efficacy of care at home and limited manual dexterity are mentioned in the literature as being responsible for the severity of the gingivitis observed since the stage of infancy of DS individuals¹³, the DS children examined in the present study had better oral hygiene habits than non-DS children of the same age. DS children had a higher daily

frequency of toothbrushing and more supervised toothbrushing by parents/guardians than control group. This fact may explain the lower plaque and gingival bleeding indices found in this study for DS children. Although some studies claim that DS people have increased susceptibility to periodontal disease, this study showed that a better quality of toothbrushing, reflected by the higher daily frequency toothbrushing and the supervision of a parents or guardians, takes the slightest presence of plaque and gingival bleeding, Therefore, periodontal disease can be controlled in this population, even though these individuals have greater susceptibility.

Regarding the average counts of mutans streptococci in saliva, the present study verified no difference comparing the groups (DS and non-DS children). Stabholz et al.⁸ also has not found significant difference count of mutans streptococci in children with DS of 8-13 years old compared to non-DS individuals. However, the results of the present study do not agree with those found by Areias et al.¹⁶ that found lower mutans streptococci counts in saliva of individuals with DS aged 6 to 18 years old compared with non-DS siblings. The study by Areias et al.¹⁶ may have found the same average of mutans streptococci counts between groups because they did not differed individuals with and without caries experience. More important than comparing average total of this microorganism would identify, within each group, those individuals with and without caries experience. Thus, when it categorizes the mutans streptococci counts in low, medium and high it is possible to establish an association with caries. Although the average counts are similar in both groups, in the present study, DS children were associated with high counts of mutans streptococci in saliva (above 10^6 CFU/mL). When the children were divided in have caries experience or not, it was found that DS children with caries experience were those associated with high counts of mutans streptococci in saliva. This result agrees with Mathias et al.¹³ that has found more DS children with high count of mutans streptococci in saliva compared with non-DS children, although not divided in subjects with and without caries. Another study showed that children with a mean value of $>10^6$ mutans streptococci per mL of saliva showed a considerably higher caries activity than did those with lower levels of mutans streptococci infection²⁷. One of the reasons for this increased amount of mutans streptococci in the saliva can be due to reduced salivary flow¹⁶, differences in the saliva and microbiota composition⁷ or metabolic factors caused by this syndrome with oral manifestation²⁸.

Some methodological issues should be discussed in the present study. The first one is about the choice of control group. Some studies used siblings age-matched as control group in order to have a similarity of some variables, such as diet and socioeconomic status, between the DS and control group^{3,7}. In this study the daily frequency of sucrose intake and household income were investigated, and no differences were observed between the groups. The second issue is regarding the method for the assessment of caries. The present study used the criteria recommended by WHO²¹ which is efficient to detect dental cavities. The use of a method that includes non-cavitated lesions could be a way to better observe the treatment needs of this population to work with non-surgical preventive strategies. In this study, WHO criterion was chosen primarily for objectivity, since the clinical examinations were performed in children unwieldy. The WHO criteria also allows to compare the results with previous studies and it is widely used in epidemiological studies with DS individuals^{3,5,13} and so it was chosen for this study.

The sample used in this study presented a good distribution regarding age and gender in both groups. Moreover, many studies have large amplitude at the age of participants, which complicates comparison of results, since the age is a determining factor at onset of diseases. This study worked within a narrow age range (6 to 12 years-old children).

This study presented a limitation regarding number of saliva samples of the DS children. Some children had no saliva collected because they did not know how to spit or refused to make the collection.

Based on the results of the present study, it can be concluded that DS children aged between 6 and 12 years present similar caries experience, lower PI and GBI when compared to non-DS age matched children. Lower PI and GBI were observed in DS children, presumably due to they have better toothbrushing (higher toothbrushing frequency and more supervised toothbrushing by parents or guardians) compared to non-DS children. Nevertheless, when DS children had caries, they were associated with high counts of mutans streptococci in saliva.

Further studies are suggested to study other variables that may be involved or that may influence the oral health status of DS individuals, such as immunological issues, biochemistry of saliva/dental biofilm and genotyping of oral microorganisms.

Acknowledgements

The authors wish to thank all the children and their parents or guardians for their valuable participation in this study.

Conflict of Interest Disclosure Statement

The authors, Maurício J. S. Moreira, Carolina Schwertner, Clarissa G. Stegues and Lina N. Hashizume have no commercial interests to disclose.

References

1. Mikkelsen M. The incidence of Down's syndrome and progress towards its reduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1988; **319**:315-24.
2. Desai SS. Down syndrome: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997; **84**:279-85.
3. Areias CM, Sampaio-Maia B, Guimaraes H, Melo P, Andrade D. Caries in Portuguese children with Down syndrome. *Clinics (Sao Paulo).* 2011; **66**:1183-6.
4. Shore S, Lightfoot T, Ansell P. Oral disease in children with Down syndrome: causes and prevention. *Community Pract.* 2010; **83**:18-21.
5. Cogulu D, Sabah E, Kutukculer N, Ozkinay F. Evaluation of the relationship between caries indices and salivary secretory IgA, salivary pH, buffering capacity and flow rate in children with Down's syndrome. *Arch Oral Biol.* 2006; **5**:23-8.
6. Davidovich E, Aframian DJ, Shapira J, Peretz B. A comparison of the sialochemistry, oral pH, and oral health status of Down syndrome children to healthy children. *Int J Paediatr Dent.* 2010; **20**:235-41.
7. Macho V, Palha M, Macedo AP, Ribeiro O, Andrade C. Comparative study between dental caries prevalence of Down syndrome children and their siblings. *Spec Care Dentist.* 2013; **33**:2-7.
8. Stabholz A, Mann J, Sela M, Schurr D, Steinberg D, Shapira J. Caries experience, periodontal treatment needs, salivary pH, and Streptococcus mutans counts in a preadolescent Down syndrome population. *Spec Care Dentist.* 1991; **11**:203-8.
9. Barnett ML, Press KP, Friedman D, Sonnenberg EM. The prevalence of periodontitis and dental caries in a Down's syndrome population. *J Periodontol.* 1986; **57**:288-93.

10. Morinushi T, Lopatin DE, Tanaka H. The relationship between dental caries in the primary dentition and anti *S. mutans* serum antibodies in children with Down's syndrome. *J Clin Pediatr Dent.* 1995; **19**:279-84.
11. Fung K, Allison PJ. A comparison of caries rates in non-institutionalized individuals with and without Down syndrome. *Spec Care Dentist.* 2005; **25**:302-10.
12. Ulseth JO, Hestnes A, Stovner LJ, Storhaug K. Dental caries and periodontitis in persons with Down syndrome. *Spec Care Dentist.* 1991; **11**:71-3.
13. Mathias MF, Simionato MR, Guará RO. Some factors associated with dental caries in the primary dentition of children with Down syndrome. *Eur J Paediatr Dent.* 2011; **12**:37-42.
14. Oredugba FA. Oral health condition and treatment needs of a group of Nigerian individuals with Down syndrome. *Downs Syndr Res Pract.* 2007; **12**:72-6.
15. Köhler B, Pettersson BM, Bratthall D. Streptococcus mutans in plaque and saliva and the development of caries. *Scand J Dent Res.* 1981; **89**:19-25.
16. Areias C, Sampaio-Maia B, Pereira MeL, Azevedo A, Melo P, Andrade C, et al. Reduced salivary flow and colonization by mutans streptococci in children with Down syndrome. *Clinics (Sao Paulo).* 2012; **67**:1007-11.
17. Reuland-Bosma W, van Dijk J. Periodontal disease in Down's syndrome: a review. *J Clin Periodontol.* 1986; **13**:64-73.
18. Amaral Loureiro AC, Oliveira Costa F, Eustáquio da Costa J. The impact of periodontal disease on the quality of life of individuals with Down syndrome. *Downs Syndr Res Pract.* 2007; **12**:50-4.
19. World Health Association. Declaration of Helsinki France. 2008. <http://www.who.int/en/>. [accessed 12 July 2013]
20. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975; **25**:229-35.
21. World Health Organization. Oral Health Surveys: basic methods. 3th ed. 1987. page 53.
22. Shklair IL, Keene HJ. A biochemical scheme for the separation of the five varieties of Streptococcus mutans. *Arch Oral Biol.* 1974; **19**:1079-81.
23. Klock B, Krasse B. Microbial and salivary conditions in 9- to 12-year-old children. *Scand J Dent Res.* 1977; **85**:56-63.
24. Vigild M. Dental caries experience among children with Down's syndrome. *J Ment Defic Res.* 1986; **30**:271-6.

25. Teitelbaum AP, Pochapski MT, Jansen JL, Sabbagh-Haddad A, Santos FA, Czlusniak GD. Evaluation of the mechanical and chemical control of dental biofilm in patients with Down syndrome. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2009; **37**:463-7.
26. Shapira J, Stabholz A, Schurr D, Sela MN, Mann J. Caries levels, Streptococcus mutans counts, salivary pH, and periodontal treatment needs of adult Down syndrome patients. *Spec Care Dentist.* 1991; **11**:248-51.
27. Zickert I, Emilson CG, Krasse B. Correlation of level and duration of Streptococcus mutans infection with incidence of dental caries. *Infect Immun.* 1983; **39**:982-5.
28. Chaushu S, Chaushu G, Zigmond M, Yefenof E, Stabholz A, Shapira J, et al. Age-dependent deficiency in saliva and salivary antibodies secretion in Down's syndrome. *Arch Oral Biol.* 2007; **52**:1088-96.

Table 1. Characterization of the sample and comparison between the DS and non-DS children.

	DS (n=60)	Non-DS (n=71)	P-value
Gender			
Male n (%)	33 (55.0)	33 (46.4)	0.426*
Female n (%)	27 (45.0)	38 (53.6)	
Age mean \pm SD	8.9 \pm 1.92	8.68 \pm 1.87	0.988**
Daily frequency of sucrose intake, Med (min-max)	3 (0-9)	2 (0-8)	0.590***
Daily frequency of toothbrushing, Med (min-max)	3 (1-3)	2 (1-3)	0.033***
Supervised toothbrushing by parents/guardians			
Yes (%)	75.5	6.0	< 0.001***
No (%)	24.5	94.0	
Household income (USD) med (min-max)	533 (222-4.400)	602 (66-4.800)	0.607***

SD: Standard deviation. Med: median. Min: minimum. Max: maximum. * Chi-square test ** Student *t* test *** Mann-Whitney *U* test.

Table 2. Clinical variables analyzed in this study for each group.

	DS (n=60)	Non-DS (n=71)	P-value
PI % mean \pm SD	17.31 \pm 17.49	27.14 \pm 22.19	0.009*
GBI % mean \pm SD	25.89 \pm 17.81	37.74 \pm 17.91	< 0.001*
DMFT med (min-max)	0 (0-5)	0 (0-4)	0.127**
dmft med (min-max)	0 (0-20)	0.5 (0-15)	0.524**
Caries-free rate %	57.0	45.0	0.251***

PI: Plaque index. GBI: Gingival bleeding index. SD: Standard deviation. Med: median. Min: minimum. Max: maximum. * Student *t* test ** Mann-Whitney *U* test *** Chi-square test

Table 3. Association between salivary counts of mutans streptococci (MS) and each group (DS and non-DS children).

MS counts (CFU/mL)	DS children	Non-DS children	P-value
	n (%)	n (%)	
Low ($\leq 10^5$)	21 (50.0)	29 (41.4)	
Medium (10^5 - 10^6)	11 (26.2)**	36 (51.4)*	0.007***
High ($\geq 10^6$)	10 (23.8)*	5 (7.1)**	
Total	42	70	

* Significant direct adjusted residuals ** Significant indirect adjusted residuals *** Chi-square test

Table 4. Association between salivary counts of mutans streptococci (MS) and caries experience in DS and non-DS children.

MS counts (CFU/mL)	DS children (n=42)		Non-DS children (n=70)		<i>P</i> -value
	CF	CC	CF	CC	
Low ($\leq 10^5$)	15	6	20	9	
Medium (10^5 - 10^6)	4	7	10	26*	0.030**
High ($\geq 10^6$)	4	6*	2	3	
Total	23	19	32	38	

CF: Caries-free children. CC: Children with caries experience. * Significant direct adjusted residuals **Chi-square test

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos resultados do presente estudo chega-se às seguintes considerações finais a respeito de crianças com síndrome de Down na faixa etária de 6 a 12 anos, residentes na cidade de Porto Alegre, RS:

- Apresentam experiência de cárie, em dentição decídua e permanente, semelhante àquela de crianças sem a síndrome da mesma faixa etária.

- Apresentam índices de placa e de sangramento gengival menores que crianças sem a síndrome da mesma faixa etária, e estas duas variáveis estão associadas com uma melhor qualidade da escovação dentária recebida, ou seja, uma maior supervisão por parte dos pais ou responsáveis durante as escovações.

- Crianças com SD apresentam altas contagens de *Streptococcus mutans* na saliva estando este fato associado à experiência de cárie destas crianças.

REFERÊNCIAS

1. Bernal JE, Briceno I. Genetic and other diseases in the pottery of Tumaco-La Tolita culture in Colombia-Ecuador. *Clin Genet*. 2006;70(3):188-91.
2. Martinez-Frias ML. The real earliest historical evidence of Down syndrome. *Am J Med Genet A*. 2005;132A(2):231.
3. Down JL. Observations on an ethnic classification of idiots. 1866. *Ment Retard*. 1995;33(1):54-6.
4. LEJEUNE J, GAUTIER M, TURPIN R. [Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children]. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1959;248(11):1721-2.
5. LEJEUNE J, TURPIN R, GAUTIER M. [Mongolism; a chromosomal disease (trisomy)]. *Bull Acad Natl Med*. 1959;143(11-12):256-65.
6. JACOBS PA, BAIKIE AG, COURT BROWN WM, STRONG JA. The somatic chromosomes in mongolism. *Lancet*. 1959;1(7075):710.
7. Society NDS. Down Syndrome [cited 2013 14/07/2013]. Available from: <http://www.ndss.org/>.
8. Down M. Síndrome de Down 2013 [cited 2013 14/07/2013]. Available from: <http://www.movimentodown.org.br>.
9. Estatística IBdGe. População [cited 2013 14/07/2013]. Available from: 1. <http://www.ibge.gov.br>.
10. Bull MJ, Genetics Co. Health supervision for children with Down syndrome. *Pediatrics*. 2011;128(2):393-406.
11. Chapman RS, Hesketh LJ. Behavioral phenotype of individuals with Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2000;6(2):84-95.
12. Coe DA, Matson JL, Russell DW, Slifer KJ, Capone GT, Baglio C, et al. Behavior problems of children with Down syndrome and life events. *J Autism Dev Disord*. 1999;29(2):149-56.
13. Dykens EM. Psychiatric and behavioral disorders in persons with Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2007;13(3):272-8.
14. Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet*. 2004;5(10):725-38.
15. Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Baddour LM, Levison M, et al. Prevention of infective endocarditis: guidelines from the American Heart Association: a guideline from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and

Anesthesia, and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *J Am Dent Assoc.* 2008;139 Suppl:3S-24S.

16. Wilson MD. Special considerations ... for the dental professional for patients with Down's syndrome. *J Okla Dent Assoc.* 1994;84(3):24-6.
17. Desai SS. Down syndrome: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997;84(3):279-85.
18. Areias CM, Sampaio-Maia B, Guimaraes H, Melo P, Andrade D. Caries in Portuguese children with Down syndrome. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(7):1183-6.
19. de Moraes ME, de Moraes LC, Dotto GN, Dotto PP, dos Santos LR. Dental anomalies in patients with Down syndrome. *Braz Dent J.* 2007;18(4):346-50.
20. Townsend GC. Dental crown variants in children and young adults with Down syndrome. *Acta Odontol Pediatr.* 1986;7(2):35-9.
21. Montero MJ, Douglass JM, Mathieu GM. Prevalence of dental caries and enamel defects in Connecticut Head Start children. *Pediatr Dent.* 2003;25(3):235-9.
22. Seow WK. Clinical diagnosis of enamel defects: pitfalls and practical guidelines. *Int Dent J.* 1997;47(3):173-82.
23. Ondarza A, Jara L, Muñoz P, Blanco R. Sequence of eruption of deciduous dentition in a Chilean sample with Down's syndrome. *Arch Oral Biol.* 1997;42(5):401-6.
24. Jara L, Ondarza A, Blanco R, Valenzuela C. The sequence of eruption of the permanent dentition in a Chilean sample with Down's syndrome. *Arch Oral Biol.* 1993;38(1):85-9.
25. Barnett ML, Press KP, Friedman D, Sonnenberg EM. The prevalence of periodontitis and dental caries in a Down's syndrome population. *J Periodontol.* 1986;57(5):288-93.
26. Stabholz A, Mann J, Sela M, Schurr D, Steinberg D, Shapira J. Caries experience, periodontal treatment needs, salivary pH, and *Streptococcus mutans* counts in a preadolescent Down syndrome population. *Spec Care Dentist.* 1991;11(5):203-8.
27. Cogulu D, Sabah E, Kutukculer N, Ozkinay F. Evaluation of the relationship between caries indices and salivary secretory IgA, salivary pH, buffering capacity and flow rate in children with Down's syndrome. *Arch Oral Biol.* 2006;51(1):23-8.
28. Davidovich E, Aframian DJ, Shapira J, Peretz B. A comparison of the sialochemistry, oral pH, and oral health status of Down syndrome children to healthy children. *Int J Paediatr Dent.* 2010;20(4):235-41.

29. Areias C, Sampaio-Maia B, Pereira MeL, Azevedo A, Melo P, Andrade C, et al. Reduced salivary flow and colonization by mutans streptococci in children with Down syndrome. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(9):1007-11.
30. Macho V, Palha M, Macedo AP, Ribeiro O, Andrade C. Comparative study between dental caries prevalence of Down syndrome children and their siblings. *Spec Care Dentist*. 2013;33(1):2-7.
31. Morinushi T, Lopatin DE, Tanaka H. The relationship between dental caries in the primary dentition and anti *S. mutans* serum antibodies in children with Down's syndrome. *J Clin Pediatr Dent*. 1995;19(4):279-84.
32. Vigild M. Dental caries experience among children with Down's syndrome. *J Ment Defic Res*. 1986;30 (Pt 3):271-6.
33. Fung K, Allison PJ. A comparison of caries rates in non-institutionalized individuals with and without Down syndrome. *Spec Care Dentist*. 2005;25(6):302-10.
34. Ulseth JO, Hestnes A, Stovner LJ, Storhaug K. Dental caries and periodontitis in persons with Down syndrome. *Spec Care Dentist*. 1991;11(2):71-3.
35. Mathias MF, Simionato MR, Guaré RO. Some factors associated with dental caries in the primary dentition of children with Down syndrome. *Eur J Paediatr Dent*. 2011;12(1):37-42.
36. Oredugba FA. Oral health condition and treatment needs of a group of Nigerian individuals with Down syndrome. *Downs Syndr Res Pract*. 2007;12(1):72-6.
37. Reuland-Bosma W, van Dijk J. Periodontal disease in Down's syndrome: a review. *J Clin Periodontol*. 1986;13(1):64-73.
38. Shapira J, Stabholz A, Schurr D, Sela MN, Mann J. Caries levels, Streptococcus mutans counts, salivary pH, and periodontal treatment needs of adult Down syndrome patients. *Spec Care Dentist*. 1991;11(6):248-51.
39. Amano A, Kishima T, Kimura S, Takiguchi M, Ooshima T, Hamada S, et al. Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. *J Periodontol*. 2000;71(2):249-55.
40. Sakellari D, Arapostathis KN, Konstantinidis A. Periodontal conditions and subgingival microflora in Down syndrome patients. A case-control study. *J Clin Periodontol*. 2005;32(6):684-90.
41. Khocht A, Yaskell T, Janal M, Turner BF, Rams TE, Haffajee AD, et al. Subgingival microbiota in adult Down syndrome periodontitis. *J Periodontal Res*. 2012;47(4):500-7.
42. Loesche WJ, Rowan J, Straffon LH, Loos PJ. Association of Streptococcus mutants with human dental decay. *Infect Immun*. 1975;11(6):1252-60.

43. Köhler B, Pettersson BM, Bratthall D. Streptococcus mutans in plaque and saliva and the development of caries. Scand J Dent Res. 1981;89(1):19-25.
44. Zickert I, Emilson CG, Krasse B. Correlation of level and duration of Streptococcus mutans infection with incidence of dental caries. Infect Immun. 1983;39(2):982-5.
45. Lang NP, Hotz PR, Gusberti FA, Joss A. Longitudinal clinical and microbiological study on the relationship between infection with Streptococcus mutans and the development of caries in humans. Oral Microbiol Immunol. 1987;2(1):39-47.

ANEXO A**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

A professora Lina Hashizume e seus alunos Maurício Moreira, Carolina Schwertner, Clarissa Stegues e Débora Grando da Faculdade de Odontologia da UFRGS solicitam a participação de seu filho (a) na pesquisa “Avaliação das condições de saúde bucal e níveis de *Streptococcus mutans* na saliva de crianças com síndrome de Down”.

Esta pesquisa tem como objetivo verificar as condições de saúde bucal de crianças com e sem síndrome de Down. Para isso, será realizado um exame clínico bucal e coleta de saliva. O responsável pela criança receberá um questionário que deverá ser preenchido constando informações, tais como: idade da criança, consumo diário de açúcar, renda familiar e hábitos de escovação, dentre outros.

Como benefícios, os participantes deste estudo terão acesso ao diagnóstico de doenças bucais e receberão um relatório do exame realizado e, caso algum tratamento seja necessário, a criança será encaminhada para a Faculdade de Odontologia da UFRGS, onde receberá cuidados.

Os participantes deste estudo são selecionados ao acaso, sendo assegurada a liberdade de se recusar a participar ou se retirar da pesquisa a qualquer momento sem que isso traga qualquer prejuízo aos mesmos. As informações coletadas assim como a identidade dos indivíduos ficarão sob o poder restrito dos pesquisadores.

A pesquisadora responsável por este estudo é a professora Dra. Lina Hashizume. Contato pode ser feito pelo telefone (51) 3308-5193 e no endereço Rua Ramiro Barcelos, 2492, sala 402, Porto Alegre, RS.

Fui informado (a) que posso solicitar maiores informações a respeito da pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, pelo telefone (51) 3359-7640.

Eu, _____, responsável pela criança _____ autorizo o uso dos resultados obtidos por meio do exame clínico, coleta de saliva e questionário para fins de pesquisa. Declaro que recebi uma cópia do presente termo de consentimento livre e esclarecido.

Local e data: _____ Telefones para contato: _____

Assinatura do responsável pela criança: _____

Assinatura da pesquisadora responsável: _____

ANEXO B

**CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL
DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**