

**CAMILA FARIA CARRADA**

**BACTÉRIAS PERIODONTOPATOGÊNICAS  
DETECTADAS, IDENTIFICADAS E QUANTIFICADAS  
NA SALIVA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES  
COM SÍNDROME DE DOWN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Clínica Odontológica.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosangela Almeida Ribeiro – C.D., Me., Dr<sup>a</sup>.**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dionéia Evangelista Cesar – Lic., Me., Dr<sup>a</sup>.**

Juiz de Fora

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

CARRADA, CAMILA FARIA.

Bactérias periodontopatogênicas detectadas, identificadas e quantificadas na saliva de crianças e adolescentes com síndrome de Down / CAMILA FARIA CARRADA. -- 2015.

83 f.

Orientadora: Rosangela Almeida Ribeiro

Coorientadora: Dionéia Evangelista Cesar

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, 2015.

1. Síndrome de Down. 2. Doenças Periodontais. 3. Bactérias. 4. Hibridização In Situ Fluorescente. I. Almeida Ribeiro, Rosangela, orient. II. Evangelista Cesar, Dionéia, coorient. III. Título.

**CAMILA FARIA CARRADA**

**BACTÉRIAS PERIODONTOPATOGÊNICAS DETECTADAS, IDENTIFICADAS E  
QUANTIFICADAS NA SALIVA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES  
COM SÍNDROME DE DOWN**

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosangela Almeida Ribeiro**  
**CO-ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dionéia Evangelista Cesar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica,  
da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora,  
como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.  
Área de concentração: Clínica Odontológica

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosangela Almeida Ribeiro  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dionéia Evangelista Cesar  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Lopes Devito  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Saul Martins de Paiva  
Universidade Federal de Minas Gerais

## DEDICATÓRIA

*É com grande carinho que dedico este trabalho a todas as crianças e adolescentes com síndrome de Down.*

## AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por iluminar o meu caminho e colocar nele pessoas tão especiais.

Aos meus pais, **Márcio e Margarida**, e minha irmã **Marcela**, pelo amor incondicional e grande apoio em todos os momentos da vida.

A toda minha **Família e Amigos** pelo grande incentivo e torcida.

À **Professora Rosangela**, por todos os ensinamentos, dedicação, confiança e oportunidades que me ofereceu durante esses anos. Agradeço por toda influência em minha formação acadêmica, profissional e como pesquisadora que a fará sempre minha referência e exemplo profissional. Obrigada também pela relação de afeto e carinho durante todos esses anos. Esta conquista é nossa.

À **Professora Dionéia**, por nos acolher de forma tão carinhosa fazendo com que nos sentíssemos realmente parte da família Lebiom. Agradeço a paciência, a disponibilidade e todos os ensinamentos.

À **Professora Fernanda**, por toda participação e acompanhamento dessa trajetória. Agradeço toda contribuição no desenvolvimento do trabalho e as palavras de amizade durante esse período.

Ao **Professor Luiz Cláudio**, pelos ensinamentos e por me receber sempre de forma tão gentil.

Às **Professoras Karina e Neuza**, pela grande contribuição no desenvolvimento da pesquisa e em minha formação acadêmica e profissional. Espero conseguir demonstrar o imenso carinho que sinto por vocês.

Ao **Professor Alessandro** e a todos os **Amigos do Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Micro-organismos**, que estiveram sempre solícitos, interessados e disponíveis a ajudar no desenvolvimento do trabalho.

Aos **Professores do Departamento de Odontologia Social e Infantil**, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, por todos os ensinamentos e torcida durante essa caminhada.

À **Flávia**, com quem dividi todas as dúvidas, inseguranças, conquistas e êxitos deste trabalho. Com quem aprendi a admirar ainda mais o universo das crianças com síndrome de Down. Uma parceria que se tornou amizade. Agradeço muito esse belo encontro da vida e divido com você também essa conquista.

Aos **colegas do Curso de Pós-graduação em Clínica Odontológica**, por todas as experiências e aprendizados compartilhados.

Ao **Grupo PET-Odontologia-UFJF**, pela oportunidade de participar de suas atividades e pela disponibilidade para utilização de seu espaço físico.

A toda **equipe da APAE-JF**, pela atenção e disposição em contribuir com a realização deste estudo.

Ao **Dr. Antônio Aguiar e sua equipe**, pela disponibilidade em nos receber e colaborar com a execução deste trabalho.

A todas as **mães voluntárias e pequenos pacientes**, pelo interesse pelo projeto e pela participação na pesquisa. Obrigada pela confiança e carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa Tutoria REUNI, pela concessão de bolsa.

Muito obrigada!

## EPÍGRAFE

*“Porque a Seus anjos Ele dará ordens a seu respeito,  
para que o protejam em todos os seus caminhos.”*

*Salmos 91:11*

## RESUMO

É de fundamental importância investigar a colonização de periodontopatógenos e seu papel na etiologia da doença periodontal de crianças e adolescentes com síndrome de Down, os quais apresentam alta prevalência da doença. O objetivo deste estudo foi avaliar qualitativa e quantitativamente a presença na saliva de bactérias periodontopatogênicas em crianças e adolescentes com e sem síndrome de Down. Este estudo transversal incluiu uma amostra de trinta crianças e adolescentes com síndrome de Down (grupo SD), com idade entre 3-12 anos, e trinta controles sem a síndrome (grupo ND), com idades entre 4-12 anos. Exame clínico foi realizado para determinar o índice de sangramento à sondagem e o índice de placa em dentes índice. Amostras de saliva não estimuladas foram coletadas de todos os participantes. A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) identificou a presença e as densidades de oito bactérias periodontopatogênicas na saliva. O teste qui-quadrado foi utilizado para analisar as variáveis categóricas e o teste *U* de Mann-Whitney foi utilizado para as variáveis numéricas. Adotou-se um nível de significância de 5%. Os registros clínicos mostraram frequência mais alta de crianças e adolescentes com sangramento à sondagem no grupo SD ( $P = 0,037$ ); nenhuma diferença foi encontrada em relação ao índice de placa entre os grupos ( $P = 0,516$ ). Crianças e adolescentes com síndrome de Down apresentaram densidades maiores de *Campylobacter rectus* ( $P = 0,013$ ), *Porphyromonas gingivalis* ( $P = 0,025$ ), *Treponema denticola* ( $P = 0,026$ ), *Fusobacterium nucleatum* ( $P = 0,013$ ), *Prevotella intermedia* ( $P = 0,001$ ) e *Prevotella nigrescens* ( $P = 0,008$ ). Nenhuma diferença significativa foi encontrada nas densidades de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ( $P = 0,057$ ) e *Tanarella forsythia* ( $P = 0,584$ ). No grupo SD, as densidades das bactérias do complexo laranja foram significativamente maiores nas faixas etárias de 3 a 7 anos para *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *P. nigrescens*, e de 8 a 12 anos para *C. rectus*. Os resultados confirmam que crianças e adolescentes com síndrome de Down apresentam maior suscetibilidade à doença periodontal e maior prevalência e densidade de patógenos periodontais importantes para o estabelecimento e agravamento da doença periodontal.

**Palavras-chave:** Síndrome de Down; Doenças Periodontais; Bactérias; Hibridização In Situ Fluorescente.

## **ABSTRACT**

It is of particular importance to investigate the colonization of periodontal pathogens and their role in the etiology of periodontal disease in children and adolescents with Down syndrome, who have a high prevalence of periodontal disease. The aim of this study was to assess qualitatively and quantitatively the presence of periodontopathogenic bacteria in saliva in a group of Down and non-Down syndrome children and adolescents. This cross-sectional study included a sample of 30 Down syndrome children and adolescents (group DS), aged 3-12 years, and 30 non-Down syndrome children and adolescents (group ND) aged 4-12 years. Dental examinations were performed to determine the bleeding on probing index and plaque index in index teeth. Unstimulated whole saliva samples were collected from all participants. The fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique identified the presence and density of eight periodontopathogenic bacteria in saliva. The chi-square test was used to analyze the categorical variables and the Mann-Whitney *U* test was used for the continuous variables. The significance level was set at 5%. Clinical records showed a higher frequency of children and adolescents with bleeding on probing in DS group ( $P = 0.037$ ); no significant difference was found in relation to plaque index between the groups ( $P = 0.516$ ). Down syndrome children showed higher salivary density of *Campylobacter rectus* ( $P = 0.013$ ), *Porphyromonas gingivalis* ( $P = 0.025$ ), *Treponema denticola* ( $P = 0.026$ ), *Fusobacterium nucleatum* ( $P = 0.013$ ), *Prevotella intermedia* ( $P = 0.001$ ) and *Prevotella nigrescens* ( $P = 0.008$ ). No significant difference was found in salivary density of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ( $P = 0.057$ ) and *Tannerella forsythia* ( $P = 0.584$ ). In DS group, the densities of bacteria of orange complex were higher in the age groups 3-7 years for *F. nucleatum*, *P. intermedia* and *P. nigrescens*, as well as in age groups 8-12 years for *C. rectus*. *The results confirm that Down syndrome children and adolescents have an increased susceptibility to periodontal disease and higher prevalence and density of important periodontal pathogens for the onset and worsening of the periodontal disease.*

**Keywords:** Down Syndrome; Periodontal Disease; Microbiology/bacteria; In Situ Hybridization, Fluorescence.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Quadro 1.** Marcadores Cy3 em oligonucleotídeos RNAr (Operon Technologies®) para a identificação dos micro-organismos orais.

**Figura 1.** Frequência das bactérias avaliadas nos grupos SD e ND.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Marcadores Cy3 em oligonucleotídeos RNAr (Operon Technologies®) para a identificação dos micro-organismos orais.	45
<b>Tabela 2.</b>	Características da amostra em relação à idade e sexo.	47
<b>Tabela 3.</b>	Resultados do índice de sangramento à sondagem.	47
<b>Tabela 4.</b>	Resultados do índice de placa do Silness e Løe (1964).	47
<b>Tabela 5.</b>	Medidas descritivas e resultado do teste <i>U</i> de Mann-Whitney (média dos postos) para comparação da densidade de bactérias (cél/mL X 10 <sup>8</sup> ) na saliva de crianças e adolescentes dos grupos SD e ND.	48
<b>Tabela 6.</b>	Resultado do teste <i>U</i> de Mann-Whitney (média dos postos) para comparação da densidade na saliva de bactérias do complexo laranja e do complexo vermelho entre crianças e adolescentes do grupo SD e do grupo ND em faixas etárias de 3-7 anos e 8-12 anos.	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APAE	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
BANA	Benzoyl-DL-arginine-naphthylamide
CD	Cirurgião-dentista
CEP-HU-CAS	Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora
Cy3	Carbocianina
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DSD	Dodecil sulfato de sódio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
FA	Frequência absoluta
FR	Frequência relativa
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FO	Faculdade de Odontologia
HCl	Ácido clorídrico
HU	Hospital Universitário
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IP	Índice de placa
ISS	Índice de sangramento à sondagem
LPS	Lipopolissacarídeo
MPM	Metaloproteína
NaCl	Cloreto de sódio
ND	Não Down
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Ph	Potencial hidrogeniônico
Pg	Prostaglandina
RNA	Ácido ribonucléico

RNAr	Ácido ribonucléico ribossômico
SD	Síndrome de Down
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora

## LISTA DE SÍMBOLOS

Ca	Cálcio
C	Centígrado
Cél	Células
Cl	Cloro
°	Graus
H	Hora
$\kappa$	<i>Kappa</i> (letra grega)
K	Potássio
L	Litro
M	Molar
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Min	Minuto
Ng	Nanograma
n <sup>o</sup>	Número
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ m	Micrometro
n	Tamanho da amostra
$P$	Nível de significância
$R$	Coefficiente de correlação
=	Igual a
+	Presença
-	Ausência
>	Maior que
$\pm$	Mais ou menos
®	Marca registrada
<	Menor que
-	Negativo

%	Por cento
v/v	Concentração
X	Vezes

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>	19
2.1 DOENÇA PERIODONTAL EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE DOWN	19
2.2 MICROBIOLOGIA DA DOENÇA PERIODONTAL	21
2.3 MICROBIOLOGIA DA DOENÇA PERIODONTAL EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM SÍNDROME DE DOWN	24
2.4 TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE ( <i>FISH</i> )	26
<b>3 PROPOSIÇÃO</b>	29
<b>4 METODOLOGIA</b>	30
4.1 TIPO DE ESTUDO	30
4.2 ASPÉCTOS ÉTICOS	30
4.3 CASUÍSTICA	30
4.3.1 Seleção da amostra	30
4.3.1.1 Critérios de inclusão	31
4.3.1.2 Critérios de exclusão	31
4.3.1.3 Grupos	31
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.4.1 Dados de identificação e da condição periodontal	32
4.4.2 Detecção, identificação e quantificação de bactérias periodontopatogênicas	33
4.4.2.1 Coleta da saliva	33
4.4.2.2 Análise laboratorial	33
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
<b>5 ARTIGO CIENTÍFICO</b>	36
<b>6 REFERÊNCIAS</b>	64
<b>APÊNDICE</b>	72
<b>ANEXO A</b>	75
<b>ANEXO B</b>	78

# 1 INTRODUÇÃO

A síndrome de Down (SD) é a uma desordem genética que se constitui em uma das principais causas da deficiência mental de origem pré-natal. Resultante de um erro na distribuição cromossômica durante a divisão celular, pode se apresentar das seguintes formas: trissomia do cromossomo 21 (95% dos casos); mosaico (2-4%); translocação (2-4%); e outros rearranjos estruturais (< 1%) (ANGÉLICO, 2004; KAMINKER e ARMANDO, 2008).

Dentre as características fenotípicas da síndrome, destacam-se: atraso neuropsicomotor; baixa estatura; encurtamento das extremidades; pescoço curto e largo; olhos amendoados; rosto arredondado; cabelo fino e esparsos; e orelhas pequenas de implantação baixa (OLIVEIRA, LUZ e PAIVA, 2007). A linguagem desses indivíduos é bastante comprometida e a deficiência mental é uma das características mais encontradas (SILVA e DESSEN, 2002). Também são frequentemente observados um sistema imune deficiente e doença cardíaca congênita (CARVALHO, CAMPOS e CRUSSOÉ-REBELLO, 2010).

Dentre as manifestações bucais mais detectadas incluem-se: má oclusão, principalmente Classe III; anomalias dentárias como agenesia, hipodontia e oligodontia; atraso na esfoliação de dentes decíduos e erupção de dentes permanentes; alteração na sequência de erupção e dentes impactados (MORAES et al., 2007; OLIVEIRA, LUZ e PAIVA, 2007). Na mucosa oral, observam-se, lacerações, úlceras traumáticas e queilite angular. A macroglossia também é uma característica encontrada. Com a idade, tanto a língua quanto os lábios tendem a desenvolver rachaduras e fissuras (CARVALHO, CAMPOS e CRUSSOÉ-REBELLO, 2010). Indivíduos com SD apresentam prevalência mais baixa de cárie dentária quando comparados aos não-sindrômicos (GONÇALVES et al., 2010; MORAES et al., 2007; SCALIONI, 2013). Por outro lado, a doença periodontal é frequentemente observada (CAVALCANTE, PIRES e SCAREL-CAMINAGA, 2009; GONÇALVES et al., 2010).

Estudo anterior mostrou que a prevalência de doença periodontal entre adolescentes com SD varia de 30 a 40%, e pode chegar a cerca de 100% em indivíduos com idade próxima de trinta anos (REULAND-BOSMA, DJIK e WEELE,

2001). Em crianças, a doença já é encontrada com grande frequência sendo considerada de acometimento precoce confirmando observações de estudos anteriores que atribuem a alta prevalência da doença a uma série de fatores locais associados à cavidade bucal, bem como a fatores sistêmicos associados à condição genética das pessoas com a síndrome. (AL HABASHNEH et al., 2012; AMANO et al., 2000; BAGIC et al., 2003; CAVALCANTE, PIRES e SCAREL-CAMINAGA, 2009; COHEN et al., 1961; FIORATI, SPÓSITO e BORSATTO, 1999; FRYDMAN e NOWZARI, 2012; LOUREIRO, COSTA e COSTA, 2007; MATHIAS, SIMIONATO e GUARÉ, 2011; MESSIAS, 2009; MORGAN, 2007; MORINUSHI, LOPATIN e VAN POPERIN, 2006; SAKELLARI, ARAPOSTATHIS e KONTANTINIDIS, 2005; TRETIN et al., 2010).

A doença periodontal compreende um grupo de condições que afetam a gengiva, o ligamento periodontal, o cemento, o osso alveolar e as estruturas teciduais que suportam os dentes (LYKO et al., 2013). De origem infecciosa, esta patologia inicia-se com o crescimento de bactérias na região do sulco gengival, colonizado principalmente por bactérias Gram-negativas, anaeróbias e microaerófilas (BOBETSI, BARROS e OFFENBACHER, 2006; TANAKA et al., 2015). Algumas das principais espécies periodontopatogênicas encontradas são: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Porphyromonas gingivalis*; *Prevotella nigrescens*; *Fusobacterium nucleatum*; *Treponema denticola* (LYKO et al., 2013); *Campylobacter rectus*; *Prevotella intermedia*; e *Tannerella forsythia* (KULEKCI et al., 2008).

É de particular importância investigar a colonização de patógenos periodontais, a fim de avaliar os riscos da doença, e, conseqüentemente, contribuir para a eficácia da prevenção e do tratamento da doença periodontal. Novas técnicas de microbiologia molecular podem fornecer ferramentas de rastreamento rápido, que têm se tornado uma abordagem de diagnóstico importante na Odontologia preventiva. (KULEKCI et al., 2008). A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (*FISH*) fornece informações sobre a morfologia, o número e a distribuição espacial de vários microorganismos (MOTER e GÖBEL 2000; SCHILLINGER et al., 2012), inclusive de bactérias periodontopatogênicas (MACHADO et al., 2012). No entanto, não há nenhuma informação sobre contagens de patógenos periodontais em crianças e adolescentes com SD determinadas pela técnica de *FISH*. Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar qualitativa e quantitativamente a presença de

bactérias periodontopatogênicas na saliva de crianças e adolescentes com síndrome de Down em comparação com crianças e adolescentes sem a síndrome.

## 2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Para melhor compreensão do tema, esta seção se propôs a revisar a literatura acerca da doença periodontal em indivíduos com SD, assim como das bactérias periodontopatogênicas, sua colonização em crianças e adolescentes com a síndrome, e sobre a utilização da técnica de *FISH* para avaliação qualitativa e quantitativa de micro-organismos da cavidade bucal.

### 2.1 DOENÇA PERIODONTAL EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE DOWN

A doença periodontal é consequência de uma reação inflamatória infecciosa iniciada por meio de um grupo de bactérias específicas capazes de causar danos aos tecidos periodontais. A doença pode se manifestar nos tecidos gengivais, sendo denominada gengivite, ou pode acometer os tecidos de suporte (ligamento periodontal, cemento e osso alveolar), classificada como periodontite (LINDHE, KARRING e LANG, 2005).

A literatura define a patologia como consequência do desequilíbrio entre a agressão das bactérias, fatores externos e a capacidade de defesa do organismo (SUZART et al., 2006; XAVIER et al., 2009). Desta forma, caso a alteração da microbiota não seja contida de forma eficaz, as bactérias se organizam na placa bacteriana que é capaz, através dos lipopolissacarídeos (LPS), de estimular o hospedeiro a ativar resposta inflamatória local produzindo neutrófilos, fibroblastos, células epiteliais e monócitos (BOBETIS, BARROS e OFFENBACHER, 2006; SUZART et al., 2006). Os neutrófilos apresentam função de liberar as metaloproteínas (MPM), responsáveis pela destruição do colágeno presente no tecido periodontal. As células restantes envolvidas no processo promovem a liberação de prostaglandinas (Pg), indutora da ação de citocinas como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral. Esta resposta inflamatória pode levar à destruição dos tecidos periodontais de suporte e às manifestações

clínicas da doença (ALMEIDA et al., 2006; BOBETSIS, BARROS e OFFENBACHER, 2006).

Clinicamente, as formas de doença periodontal são caracterizadas pelas alterações de cor, textura gengival, vermelhidão e exsudato, assim como por um aumento da tendência de sangramento à sondagem no sulco gengival. Além disso, os tecidos periodontais podem exibir resistência reduzida à sondagem e recessão tecidual. Estágios avançados de periodontite também podem estar associados ao aumento da mobilidade dentária ou perda do dente (LINDHE, KARRING e LANG, 2005).

Fatores de risco próprios ou adquiridos, como características transmitidas geneticamente, diabetes ou tabagismo podem modificar a microbiota da placa bacteriana, a apresentação clínica, a progressão da doença, a resposta ao tratamento e a suscetibilidade à patologia. É importante ressaltar que parecem existir diferenças no impacto desses fatores de risco nas formas de periodontite de estabelecimento precoce e do adulto (BORRELL e PAPAPANOU, 2005).

É bem documentado na literatura que indivíduos com SD são mais suscetíveis a esta condição do que os indivíduos que não apresentam a síndrome (FRYDMAN e NOWZARI, 2012). Observou-se nos estudos revisados que a prevalência desta doença bucal varia de 52 a 100% entre crianças e adolescentes com SD (AL HABASHNEH et al., 2012; BAGIC et al., 2003; FIORATI, SPÓSITO e BORSATTO, 1999; GONÇALVES et al., 2010; LOUREIRO, COSTA e COSTA, 2007; MATHIAS, SIMIONATO e GUARÉ, 2011; MESSIAS, 2009; SAKELLARI, ARAPOSTATHIS e KONSTANTINIDIS, 2005). Além da alta prevalência, alguns estudos mostraram que a gravidade da doença periodontal aumenta com o avanço da faixa etária (COHEN et al., 1961; FIORATI, SPÓSITO e BORSATTO, 1999; GONÇALVES et al., 2010).

A aparência clínica e radiográfica da periodontite no adulto com SD é caracterizada por um padrão localizado. Estes indivíduos apresentam índice de placa e perda óssea maiores quando comparados a indivíduos sem a síndrome (FRYDMAN e NOWZARI, 2012). Crianças com SD apresentam também uma maior tendência ao sangramento do tecido periodontal e início precoce de inflamação gengival em relação aos não sindrômicos (REULAND-BOSMA, DIJK e WEELE, 1986). Segundo Modéer, Barr e Dahllof (1990), em crianças, os dentes mais

atingidos pela doença são os incisivos inferiores e primeiros molares superiores; os caninos são os dentes de menor acometimento.

O aumento da prevalência e da gravidade da doença periodontal em pessoas com SD pode ser atribuído a fatores associados com a cavidade bucal e à condição genética. A teoria mais descrita pelos autores é a de que a imunidade diminuída devido à redução da atividade dos neutrófilos e linfócitos T, bem como um aumento da produção de mediadores inflamatórios e enzimas proteolíticas, podem contribuir para a prevalência e a gravidade da doença periodontal nestes indivíduos (FRYDMAN e NOWZARI, 2012; MORGAN, 2007; TRETIN et al., 2010). Portanto, o alto índice desta patologia observado em pessoas com SD não seria atribuído somente à pobre higienização bucal, em função da deficiência motora e neurológica, mas também a uma deficiência na capacidade de defesa do hospedeiro (CAVALCANTE, PIRES e SCAREL-CAMINAGA, 2009).

Além das alterações imunológicas, outros fatores são propostos para explicar a alta prevalência da doença periodontal e o aumento da sua gravidade em indivíduos com a síndrome, que incluem a morfologia do dente, a respiração bucal, a má oclusão e a colonização microbiana precoce por um elevado número de periodontopatógenos (CARVALHO, CAMPOS e CRUSSOÉ-REBELLO, 2010; MORGAN, 2007; TRETIN et al., 2010).

## 2.2 MICROBIOLOGIA DA DOENÇA PERIODONTAL

O fator etiológico primário para o desenvolvimento da doença periodontal é a presença de micro-organismos periodontopatogênicos. No entanto, sabe-se que a colonização bacteriana em si nem sempre é capaz de induzir alterações periodontais. Desta forma, pode-se afirmar que a ausência de manifestações clínicas da doença não indica ausência de colonização por bactérias periodontopatogênicas. As interações entre os vários grupos de bactérias e a resposta do hospedeiro desempenham um papel importante na patogênese da doença periodontal (KULEKCI et al., 2008; MESSIAS, 2009).

Socransky et al. (1998) examinaram treze mil amostras de placa bacteriana subgengival de 185 indivíduos adultos onde foram identificados seis

grupos de espécies de bactérias intimamente relacionados. Os grupos foram divididos em micro-organismos do complexo verde (*Eikenella corrodens*, *Capmocytophaga* sp, *Campylobacter concisus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo A); complexo amarelo (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus oralis*); complexo roxo (*Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*); complexo azul (*Actnomyces viscosus*, *Selenomonas noxia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo B); complexo laranja (*Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus constellatu*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter shoa*e, *Campylobacter gracilis* e *Campylobacter rectus*); e complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*), o que mostra que a doença periodontal é proveniente da presença de micro-organismos patogênicos que se associam de forma não aleatória no interior da placa bacteriana.

Os grupos amarelo, azul, verde e roxo são constituídos por grupamentos de bactérias que têm capacidade de aderir à superfície dental, constituindo a base da pirâmide da placa bacteriana, sendo classificados como colonizadores iniciais da superfície do dente (SOCRANSKY et al., 1998). Segundo alguns autores, esses complexos basais podem não estar associados às manifestações clínicas da doença e são responsáveis por fornecerem receptores e criarem condições ecológicas para a implantação das bactérias do complexo laranja. Por sua vez, o complexo laranja precede e prepara o meio para a colonização dos micro-organismos que compõem o complexo vermelho. Os dois últimos grupos compreendem as espécies consideradas como os principais agentes etiológicos da doença periodontal. São responsáveis pela periodontite crônica, estando relacionados com o aumento de profundidade da bolsa periodontal e com a presença de sangramento à sondagem (HAFFAJEE et al., 2008; SOCRANSKY et al., 1998).

As espécies *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *P. intermedia* foram consideradas as principais espécies de micro-organismos periodontopatogênicos em 1996, pela Academia Americana de Periodontia (PROCEEDING OF THE 1996 WOERLD). Wennstrom et al. (1987) observaram que os pacientes nos quais estas três espécies não estavam presentes durante um ano não sofriam perda significativa de inserção do tecido conjuntivo, enquanto 20%

daqueles em que pelo menos uma das espécies foi identificada exibiam, após esse tempo, mais de 2 mm de perda de inserção.

O desenvolvimento de novas técnicas imunológicas e da biologia molecular a partir da década de 1990 permitiu um maior conhecimento de outras espécies como agentes etiológicos da doença periodontal (PEREZ-CHAPARRO et al., 2014). Espécies como *P. nigrescens*, *F. nucleatum*, *T. denticola*, *C. rectus* e *T. forsythia* passaram a mostrar relação com a etiologia da doença (KULEKCI et al., 2008; LYKO et al., 2013; SHADDOX et al., 2012).

*P. nigrescens* é um anaeróbio obrigatório, Gram-negativo que possui pigmentação enegrecida. Esta bactéria, assim como outras com potencial periodontopatogênico, promove a liberação de mediadores inflamatórios e ocorre na infância sem sinais clínicos da doença (KULEKCI et al., 2008). Sua colonização é preferencialmente na porção média da bolsa periodontal (ETO, RASLAN e CORTELLI, 2003).

*T. denticola* é um espiroqueta comum em diversas bolsas periodontais. A principal razão pelo interesse nesse grupo de micro-organismo tem sido sua presença elevada com aumento da bolsa periodontal. Sítios sadios não exibem espiroquetas ou exibem poucos; sítios com inflamação gengival sem perda de inserção exibem índices baixos a moderados, enquanto bolsas profundas abrigam grande número destas bactérias (MARSH e MARTIN, 2005).

*F. nucleatum* é um bastonete fusiforme, anaeróbio, Gram-negativo, que é reconhecido como parte da microbiota subgengival. Sua presença também é mais encontrada em indivíduos com periodontite quando comparados a indivíduos sadios. Esse micro-organismo é capaz de induzir a morte celular por apoptose, além de induzir a liberação de citocinas, elastase e radicais de oxigênio de leucócitos. Todavia, o papel mais importante desta bactéria no ecossistema subgengival é sua função como espécie “conjugada”, facilitando a co-agregação entre espécies (JEWETT et al., 2000).

*C. rectus* é um anaeróbio, Gram-negativo e móvel. Este micro-organismo pode auxiliar o desenvolvimento da doença periodontal por aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias e auxiliar na modulação dessa resposta, o que facilita a sobrevivência da espécie no sítio infeccioso. São distribuídos nos sítios subgengivais na dentição decídua, mista e permanente de crianças (LINDHE, KARRING e LANG, 2005).

*T. forsythia* é um bastonete pleomórfico, anaeróbio, fusiforme e Gram-negativo (LINDHE, KARRING e LANG, 2005). Esta espécie apresenta uma camada-S dentada que pode contribuir para patogencidade da doença periodontal, uma vez que possibilita a adesão e a invasão de células epiteliais, produz atividade proteolítica e é capaz de induzir a apoptose. É facilmente encontrada na placa sub e supragengival e pode estar associada à forma agressiva da doença periodontal (TANNER e IZARD, 2006).

Espécies de *Eubacterium* também têm sido sugeridas como possíveis patógenos periodontais devido a seus níveis elevados nos sítios doentes (LINDHE, KARRING e LANG, 2005).

### 2.3 MICROBIOLOGIA DA DOENÇA PERIODONTAL EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM SÍNDROME DE DOWN

As limitações motoras dos indivíduos com SD, bem como as particularidades imunológicas, anatômicas e fisiológicas poderiam alterar a ocorrência e a distribuição dos principais micro-organismos responsáveis pelo desenvolvimento da doença periodontal, predispondo esses indivíduos a uma colonização mais precoce, ou mesmo interferindo na interação entre as populações microbianas no interior da placa bacteriana.

Barr-Alghome et al. (1992) investigaram a presença de alguns micro-organismos periodontopatogênicos em adolescentes com SD, pelo método de cultura. Os resultados indicaram uma composição microbiana alterada da placa subgengival do grupo com SD em comparação com controles saudáveis, com maior frequência de *A. actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga* e *P. gingivalis*.

Morinushi, Lopatin e Van Poperin (1997) realizaram exame clínico e obtiveram amostras de soro de 75 crianças e adolescentes com SD com idade entre dois e 18 anos. Os títulos de anticorpos para *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *Selenomonas sputigena*, *A. actinomycetemcomitans*, e *Streptococcus mitis*, determinados pelo teste ELISA, aumentaram com a idade e apresentaram uma correlação positiva com as manifestações clínicas da doença em crianças com SD em fase de dentição decídua.

Amano et al. (2000) avaliaram a prevalência de bactérias periodontopatogênicas em crianças com SD para determinar se patógenos específicos são adquiridos na infância. As bactérias foram identificadas pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e os resultados sugeriram que crianças com SD experimentam uma colonização muito precoce de vários periodontopatógenos em comparação com crianças sem a síndrome. Notadamente, *P. gingivalis*, *Bacteroides forsythus* e *T. denticola* foram mais prevalentes entre as crianças avaliadas, o que não ocorreu com a espécie *A. actinomycetemcomitans*.

Sakellari, Arapostathis e Konstantinidis (2005) investigaram uma possível colonização precoce por bactérias importantes para o desenvolvimento da doença periodontal, por meio da análise da microbiota subgengival de crianças, adolescentes e adultos jovens (8-28 anos de idade). As bactérias *T. forsythia* e *Actinomyces naeslundii*, detectadas pela técnica de hibridização DNA-DNA, foram encontradas em todas as faixas etárias analisadas, sendo que em idades mais avançadas, houve presença também de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *C. sputigena* e *Peptostreptococcus micros*.

Morinushi, Lopatin e Van Poperin (2006), entretanto, observaram baixos escores do teste BANA (benzoyl-DL-arginine-naphthylamide) em relação às espécies *P. gingivalis*, *T. denticola* e *B. forsythus*, apesar de maior prevalência de doença periodontal em todos os grupos etários com SD. No entanto, os autores consideraram que crianças com SD mostram reação inflamatória gengival maior aos periodontopatógenos quando comparadas a crianças não síndrômicas.

Messias (2009) não identificou diferença significativa entre a presença de micro-organismos periodontopatogênicos em crianças e adolescentes com e sem SD na faixa etária de 6 a 18 anos. A ocorrência das espécies microbianas anaeróbias e microaerófilas mais associadas ao ambiente periodontal foi semelhante nos dois grupos, independentemente da condição gengival. Houve aumento na ocorrência de *P. intermedia* e *Enterobacteriaceae* na saliva dos participantes síndrômicos, o mesmo ocorrendo com *Enterobacteriaceae*, *C. rectus*, *P. nigrescens* e gênero *Pseudomonas* na placa bacteriana supragengival e *P. intermedia* na placa bacteriana subgengival.

Martinez-Martinez et al. (2013), em estudo utilizando a técnica de PCR, encontraram as espécies *T. forsythia*, *T. denticola* e *P. gingivalis* em maior

frequência em crianças com SD com doença periodontal quando comparados ao grupo sem alteração do tecido gengival, indicando que a presença destas bactérias, que compõem o complexo vermelho, é determinante para o desenvolvimento da doença.

Vale ressaltar que comparações entre os dados de ocorrência dos principais periodontopatógenos em indivíduos com SD disponíveis na literatura podem esbarrar em limitações, que vão desde o método de detecção dos micro-organismos, à descrição das condições periodontais das populações estudadas, às características étnico-raciais dos indivíduos participantes do estudo, à forma com que os dados são apresentados, e, por fim, à identidade dos micro-organismos descritos na literatura, face às profundas mudanças taxonômicas experimentadas por alguns gêneros microbianos (MESSIAS, 2009).

#### 2.4 TÉCNICA DA HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (*FISH*)

A técnica de *FISH* – *Fluorescence In Situ Hybridization* – é uma ferramenta da biologia molecular que vem sendo empregada em análise da comunidade microbiana há mais de vinte anos (GIOVANNONI et al., 1988). Trata-se de uma técnica em que são utilizados marcadores fluorescentes que permitem a identificação filogenética de bactéria sem a necessidade de cultivo prévio (DEL'DUCA e CESAR, 2007). Tais marcadores podem ser delineados para serem altamente específicos e reconhecerem apenas um gene ou grupos de espécies. Os primeiros marcadores fluorescentes foram construídos a partir de oligonucleotídeos de RNAr e ainda hoje são os mais utilizados devido à propriedade conservativa do RNA e por esta estrutura estar presente em todos os organismos (MOTER e GÖBEL, 2000). Os marcadores podem também ser construídos com diferentes fluorocromos, sendo o Cy3 (carbocianina) o mais utilizado (DEL'DUCA e CESAR, 2007). Diversas sondas de oligonucleotídeos de RNAr adequados para *FISH* têm sido descritas, juntamente com um grande banco de dados, fornecendo, assim, uma visão abrangente de mais de setecentos estudos publicados (MOTER e GÖBEL, 2000).

A visualização dos resultados desta técnica pode ser realizada em microscopia de epifluorescência, em microscopia de varredura ou, ainda, em citometria de fluxo (DEL'DUCA e CESAR, 2007), métodos capazes de fornecer não só informações sobre a estrutura da comunidade microbiana, mas também a reconstrução exata do arranjo espacial de comunidades de bactérias em seu habitat (SCHILLINGER et al., 2012; WAGNER, HONRY e DAIMSZ, 2003).

Conforme mencionado anteriormente, a técnica de *FISH* foi introduzida na bacteriologia por Giovannoni et al. (1988), em um estudo em que usavam sondas radioativas de oligonucleotídeos de RNAr para a detecção microscópica de bactérias. No ano seguinte, Delong, Wickham e Pace (1989) realizaram uma pesquisa com sondas de oligonucleotídeos com marcadores fluorescentes, não radioativos, para a detecção de células bacterianas e observaram, ao compararem com sondas radioativas, que as fluorescentes eram mais seguras, ofereciam uma melhor resolução, não necessitavam de passos adicionais e podiam ser marcadas com corantes de diferentes comprimentos de onda, o que permitia a detecção de várias sequências com uma única hibridização.

Alguns estudos têm sido desenvolvidos para avaliar a microbiota bucal por meio da técnica de *FISH* na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), numa parceria entre a Faculdade de Odontologia (FO) e o Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos. Machado et al. (2012) avaliaram qualitativa e quantitativamente os micro-organismos *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* em amostras de placa bacteriana subgengival de vinte gestantes, no segundo trimestre de gravidez, e vinte não-gestantes. Os padrões de colonização das bactérias mais associadas com a doença periodontal na placa subgengival de gestantes e não-gestantes não apresentaram diferença estatística. O valor máximo de *P. intermedia* foi mais de quatro vezes maior nas gestantes. Entretanto, esta espécie foi identificada em 100% das não-gestantes avaliadas, ainda que em baixas densidades. Scalioni (2013) avaliou e comparou a experiência de cárie dentária e a contagem de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e gênero *Streptococcus* presente na saliva de crianças e adolescentes com SD (grupo SD) e sem SD (grupo ND). No grupo SD, observou-se uma taxa de crianças e adolescentes livres de cárie mais alta ( $P < 0,001$ ), assim como uma contagem mais baixa de *S. mutans* na saliva ( $P < 0,001$ ). Lemos (2014) avaliou, pela técnica de *FISH*, a presença de 12 agentes

patogênicos (*A. actinomycetemomitans*, *C. rectus*, *Enterococcus faecalis*, *F. nucleatum*, *P. givalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Streptococcus*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *T. Forsythia* e *T. denticola*) em 31 canais radiculares infectados de 31 dentes decíduos. Os patógenos testados foram detectados em todas as amostras. E a soma total das densidades médias de todas as espécies de bactérias e do gênero *Streptococcus* representou 80,57% da comunidade microbiana.

Thurnheer, Belibasakis, Bostanci (2014) investigaram, através da técnica de *FISH*, a colonização do epitélio gengival humano por espécies da placa bacteriana subgengival e avaliaram as consequências da colonização do tecido por espécies bacterianas do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*). Todas as espécies do complexo vermelho foram capazes de colonizar as células epiteliais gengivais. Observou-se uma tendência de colonização entre *P. gingivalis* e *T. denticola*, sendo que na ausência de todas as espécies que constituem o complexo, uma imensa colonização de streptococos (potencialmente *Streptococcus oralis*) foi observada, revelando que as espécies *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* podem influenciar na colonização bacteriana dos tecidos gengivais e ter implicações na patogênese da doença periodontal.

A contagem bacteriana na saliva ainda não consegue quantificar a gravidade da doença periodontal, o que não possibilita sua utilização como forma de diagnóstico da doença. Contudo, a análise salivar de diferentes espécies microbianas pode ser utilizada como um indicador para o potencial risco do desenvolvimento de alteração no tecido periodontal (HARIRIAN et al., 20014). Desta forma, a identificação das principais espécies associadas à doença periodontal presentes na saliva pela técnica de *FISH* pode representar um método mais fácil e eficiente de determinação do risco da doença, uma vez que esta técnica possibilita uma avaliação qualitativa e quantitativa das bactérias relacionadas à patogênese da doença periodontal.

### 3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo se propôs a avaliar qualitativa e quantitativamente espécies de bactérias periodontopatogênicas na saliva de crianças e adolescentes com síndrome de Down em comparação com crianças e adolescentes não síndrômicos.

Especificamente, este estudo se propôs a:

- Avaliar e comparar a condição periodontal de crianças e adolescentes com e sem síndrome de Down, por meio do índice de sangramento à sondagem e do índice de placa.
- Detectar, identificar, quantificar e comparar as densidades de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* na saliva de crianças e adolescentes com e sem síndrome de Down por meio da técnica de *FISH*.
- Comparar as densidades de bactérias do complexo laranja e do complexo vermelho na saliva de crianças e adolescentes com e sem síndrome de Down por faixa etária.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 TIPO DE ESTUDO**

Trata-se de um estudo transversal observacional.

### **4.2 ASPECTOS ÉTICO-LEGAIS**

O presente estudo seguiu as normas e diretrizes da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário HU-CAS da Universidade Federal de Juiz de Fora (CEP-HU-CAS-UFJF), em 28 de novembro de 2011 (Parecer nº 383/2011 – ANEXO A).

Os pais e/ou responsáveis pelas crianças e adolescentes que atendessem aos critérios de inclusão deveriam consentir na participação do menor no estudo por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – APÊNDICE). Além disso, o voluntário deveria consentir verbalmente com sua participação, concordando com a realização de exame clínico e coleta de saliva.

### **4.3 CASUÍSTICA**

#### **4.3.1 Seleção da amostra**

A amostra foi selecionada entre crianças e adolescentes, sem distinção de raça, sexo ou nível socioeconômico. Os participantes com SD foram selecionados de um grupo de fonoaudiologia na Associação de Pais e Amigos do Excepcional – APAE; os não-sindrômicos foram selecionados entre crianças e adolescentes na

mesma faixa etária matriculados em instituições de ensino do município de Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil.

#### 4.3.1.1 Critérios de inclusão

Para serem incluídos no estudo, os participantes deveriam permitir a realização dos exames intrabucais e a coleta da saliva, comparecer à consulta acompanhados do pai/mãe ou seu responsável legal, e ter idade entre três e 12 anos. Para efeito do cálculo de idade foi considerado o último aniversário.

#### 4.3.1.2 Critérios de exclusão

Seriam excluídos do estudo crianças e adolescentes que apresentassem deficiência mental grave que impossibilitasse a realização do exame clínico, cujos pais e/ou responsáveis não tivessem assinado o TCLE. Assim como aqueles com idade superior a 12 anos, em tratamento ortodôntico ou que tivessem feito uso de antibiótico sistêmico três meses antes do exame.

#### 4.3.1.3 Grupos

Os participantes que atenderam aos critérios de inclusão foram distribuídos em dois grupos, da seguinte forma:

- Grupo SD – Crianças e adolescentes com diagnóstico de síndrome de Down devidamente comprovado por meio do exame de cariótipo.
- Grupo ND – Crianças e adolescentes sem diagnóstico de síndrome de Down.

## 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.4.1 Dados de identificação e da condição periodontal

Um prontuário clínico próprio foi preenchido com os dados de identificação e da condição periodontal de todos os voluntários, avaliada de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS, 1999). Durante o exame clínico realizado sob luz artificial, o voluntário encontrava-se sentado em cadeira odontológica, obedecendo-se aos critérios de biossegurança. Antes da coleta dos dados, a concordância intraexaminador e interexaminador foi verificada pelo coeficiente *kappa* de Cohen (COHEN, 1960). Para os índices calculados, o valor obtido do coeficiente *kappa* indicou concordância quase perfeita na avaliação intraexaminador ( $\kappa = 0,93$ ) e interexaminador ( $\kappa = 0,92$ ) para o índice de sangramento a sondagem (LANDIS e KOCH, 1977).

A condição periodontal foi avaliada por meio do índice de sangramento à sondagem (AINAMO e BAY, 1975) e a versão modificada do índice de placa de Silness e Løe (1964). Para cada participante, a dentição foi dividida em seis sextantes denominados de superior direito, superior anterior, superior esquerdo, inferior direito, inferior anterior e inferior esquerdo. Para representar cada sextante, foram examinados dentes índice adotados em estudos anteriores que incluíram os seguintes dentes decíduos: incisivo central superior direito e o incisivo central inferior esquerdo (51 e 71, respectivamente), e os primeiros e segundos molares de cada sextante (54, 55, 64, 65, 74, 75, 84, 85). Quando um destes dentes estivesse ausente, deveria ser substituído pelo seu sucessor permanente ou por outro dente do mesmo sextante (BARILLI, 2003; KAUR, SHEEHY, BEIGHTIN, 2013; SANTOS et al., 2010).

O sangramento após a sondagem foi registrado nas faces mesial, distal, vestibular, palatina ou lingual dos dentes índice dez segundos após a sondagem utilizando-se sonda periodontal (PCP-UNC 15, Hu-Friedy<sup>®</sup>, Chicago, IL, EUA), de acordo com um padrão dicotômico: presença (+) ou ausência (-). A fim de calcular a prevalência de gengivite nos grupos, adotou-se como critério diagnóstico, a presença de pelo menos uma área sangrante (AINAMO e BAY, 1975).

O índice de placa foi avaliado utilizando-se sonda periodontal (PCP-UNC 15, Hu-Friedy®, Chicago, IL, USA) e espelho bucal plano. Registrou-se a presença de placa bacteriana nas superfícies vestibular, lingual, mesial e distal dos dentes índice, segundo o índice de Silness e Løe (1964), no qual são atribuídos escores de 0 a 3, da seguinte forma:

- 0 – ausência de depósitos de placa bacteriana na região cervical;
- 1 – visualização da placa bacteriana através de sua remoção com a sonda periodontal;
- 2 – visualização da placa bacteriana a olho nu;
- 3 – placa bacteriana com acúmulo abundante na superfície dental e interdental.

#### **4.4.2 Detecção, identificação e quantificação de bactérias orais**

##### **4.4.2.1 Coleta da saliva**

A amostra de saliva não estimulada foi coletada de cada voluntário depois do exame clínico, com pipeta Pasteur de plástico descartável (Qingdao AMA Co., Ltda, Shandong, China). A coleta foi realizada entre 8h00min e 12h00min (AREIAS et al., 2012; DAVIDOVICH et al., 2010), pelo menos uma hora depois de se alimentar, escovar os dentes ou enxaguar a boca (DAVIDOVICH et al., 2010).

##### **4.4.2.2 Análise laboratorial**

Após a coleta, 180 µL de saliva foram transferidos, com auxílio de pipeta automática, para um tubo de microcentrífuga contendo 20 µL de solução de paraformaldeído a 20%. As amostras foram mantidas refrigeradas e transportadas imediatamente para o Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos da UFJF. As amostras fixadas foram armazenadas a -20°C para análise microbiológica.

A identificação e a quantificação dos micro-organismos orais foram determinadas pela técnica de *FISH*. As amostras foram fixadas em paraformaldeído a 20% (concentração final de 2%) e filtradas através de filtro branco de policarbonato Milipore de 0,22 µm. Foram utilizados os marcadores Cy3 em oligonucleotídeos RNAr (Operon Technologies<sup>®</sup>, Alameda, Califórnia, EUA) para a identificação dos micro-organismos orais (Quadro 1).

**Quadro 1.** Marcadores Cy3 em oligonucleotídeos RNAr (Operon Technologies<sup>®</sup>) para a identificação dos micro-organismos orais.

Sonda	Especificidade	Sequência da Sonda (5'- 3')	Referência
EUB I, EUB II e EUB III	Bactéria	GCT GCC TCC CGT AGG AGT GCA GCC ACC CGT AGG TGT GCT GCC ACC CGT AGG TGT	Daims et al., 1999.
ACAC	<i>Aggregatibacter actinomycetemomitans</i>	TCCATAAGACAGATTC'	Sunde et al., 2003.
B/TAFO	<i>Tannerella forsythia</i>	CGTATCTCATTTTATTCCCCTGTA	Sunde et al., 2003.
CARE	<i>Campylobacter rectus</i>	TTA AACTTATGTAAAGAAG	Riep et al., 2009.
POGI	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	CAATACTCGTATCGCCCGTTATTAT TC	Sunde et al., 2003
TREII	<i>Treponema denticola</i>	GCTCCTTTCCTCATTTACCTTTAT'	Moter et al., 1998
FUS664	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	CTTGTAGTTCCGC(C/T)TACCTC	Gmür et al., 2004
Pint649	<i>Prevotella intermedia</i>	GCCGCCRCTGAASTCAAGCC	Gmür e Thurnheer, 2002
Png657	<i>Prevotella nigrescens</i>	TCCGCCTGCGCTGCGTGTA	Gmür e Thurnheer, 2002

Posteriormente, as amostras foram coradas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para contagem da densidade bacteriana total. Um marcador controle negativo (5'- 3CCTAGTGACGCCGTCGAC - 3'), que não possui especificidade para nenhum grupo bacteriano, foi utilizado para a avaliação da eficiência da hibridização (COTTRELL e KIRCHMAN, 2000). Os filtros foram, então, divididos em dez partes, uma para cada sonda específica e a décima parte para a sonda negativa. Cada pedaço de filtro foi colocado em uma lâmina de vidro revestida com parafilme e foi coberto com 30 µL da solução de hibridização em uma concentração final de 2,5 ng/µL da sonda de oligonucleotídeo. A solução de hibridização foi composta por 0,9 M de NaCl, 20 mM de Tris-HCL (pH 7,4), dodecil sulfato de sódio (DSD) a 0,01% e a

concentração de formamida específica para cada bactéria. A amostra foi incubada em uma estufa a 42°C por uma noite. Após a hibridização, a amostra foi transferida para uma solução de lavagem, contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), DSD a 0,01% e uma concentração de NaCl apropriada para a sonda específica, e então a amostra foi incubada a 48°C por 15 minutos. As células bacterianas foram coradas com 2 µg/ mL de DAPI para que pudesse ser realizada a contagem da densidade bacteriana total. Cada pedaço do filtro foi imerso em etanol 80% (v/v) por três vezes e deixado para secar. Finalmente, a lâmina foi montada utilizando glicerol e Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) na proporção de 4:1. As células bacterianas totais e de cada espécie foram contadas utilizando-se um microscópio de epifluorescência Olympus BX60 equipado com o filtro 41007a para o marcador Cy3 e o filtro 31000 para DAPI, no aumento de 1000X.

A contagem foi realizada em dez campos aleatórios por um único pesquisador treinado por pesquisador experiente. O número final de bactérias foi calculado pela multiplicação das diluições realizadas durante o tratamento da amostra. O percentual de cada espécie em relação à contagem das células bacterianas totais foi calculado. Os resultados foram expressos em céls/mL.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram organizados em um banco de dados no programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences – SPSS – versão 15.0 para Windows*. As variáveis categóricas foram descritas segundo a frequência absoluta (FA) e a frequência relativa (FR). Medidas descritivas (média, mediana, desvio-padrão, e valores mínimo e máximo) foram usadas para descrever as variáveis contínuas, relativas aos micro-organismos pesquisados. O teste qui-quadrado foi usado para análise das variáveis categóricas. O teste *U* de Mann-Whitney foi usado para amostras independentes para análise das variáveis contínuas entre os grupos. Em todas as análises, o nível de significância adotado foi de 5%.

## 5 ARTIGO CIENTÍFICO

O manuscrito apresentado nesta seção seguiu as Instruções aos Autores do periódico *International Journal of Paediatric Dentistry*, Qualis A1 na área da Odontologia, e fator de impacto = 1.54 (ANEXO B).

## FOLHA DO TÍTULO

**Título:** Bactérias periodontopatogênicas na saliva de crianças e adolescentes com síndrome de Down

**Número de palavras:** 4780

**Autores:**

CAMILA FARIA CARRADA<sup>1</sup>, FLÁVIA ALMEIDA RIBEIRO SCALIONI<sup>1</sup>, KARINA LOPES DEVITO<sup>3</sup>, LUIZ CLÁUDIO RIBEIRO<sup>4</sup>, DIONÉIA EVANGELISTA CESAR<sup>5</sup>, ROSANGELA ALMEIDA RIBEIRO<sup>6</sup>.

1. Mestre; Faculdade de Odontologia; Universidade Federal de Juiz de Fora; Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.
2. Mestre; Professora Substituta; Departamento Odontologia Social e Infantil; Faculdade de Odontologia; Universidade Federal de Juiz de Fora; Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.
3. Doutora; Professora Associada; Departamento Clínica Odontológica; Faculdade de Odontologia; Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.
4. Doutor; Professor Associado; Departamento de Estatística; Instituto de Ciências Exatas; Universidade Federal de Juiz de Fora; Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.
5. Doutora; Professora Associada; Departamento de Biologia; Instituto de Ciências Biológicas; Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

6. Doutora; Professora Titular; Departamento Odontologia Social e Infantil; Faculdade de Odontologia; Universidade Federal de; Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

**Corresponding author:**

Rosangela Almeida Ribeiro

- Departamento Odontologia Social e Infantil, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer s/n, Faculdade de Odontologia, *Campus* Universitário, Bairro Martelos, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. CEP: 36036-300. E-mail: [ralmeida@powerline.com.br](mailto:ralmeida@powerline.com.br)

## RESUMO

**Background.** É importante investigar a colonização de periodontopatógenos e seu papel na etiologia da doença periodontal de crianças e adolescentes com síndrome de Down, os quais apresentam alta prevalência da doença. **Objetivo.** O objetivo deste estudo foi avaliar qualitativa e quantitativamente a presença na saliva de bactérias periodontopatogênicas em crianças e adolescentes com e sem síndrome de Down. **Desenho do estudo.** Este estudo transversal incluiu uma amostra de trinta crianças e adolescentes com síndrome de Down (grupo SD), com idade entre 3-12 anos, e trinta controles sem a síndrome (grupo ND), com idades entre 4-12 anos. Exame clínico foi realizado para determinar o índice de sangramento à sondagem e o índice de placa em dentes índice. Amostras de saliva não estimuladas foram coletadas de todos os participantes. **Resultados.** A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (*FISH*) identificou a presença e as densidades de oito bactérias periodontopatogênicas na saliva. O teste qui-quadrado foi utilizado para analisar as variáveis categóricas e teste *U* de Mann-Whitney foi utilizado para as variáveis numéricas. Adotou-se um nível de significância de 5%. Os registros clínicos mostraram frequência mais alta de crianças e adolescentes com sangramento à sondagem no grupo SD ( $P = 0,037$ ); nenhuma diferença foi encontrada em relação ao índice de placa entre os grupos ( $P = 0,516$ ). Crianças e adolescentes com síndrome de Down apresentaram densidades maiores de *Campylobacter rectus* ( $P = 0,013$ ), *Porphyromonas gingivalis* ( $P = 0,025$ ), *Treponema denticola* ( $P = 0,026$ ), *Fusobacterium nucleatum* ( $P = 0,013$ ), *Prevotella intermedia* ( $P = 0,001$ ) e *Prevotella nigrescens* ( $P = 0,008$ ). Nenhuma diferença significativa foi encontrada nas densidades de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ( $P = 0,057$ ) e *Tanarella forsythia* ( $P = 0,584$ ). No grupo SD, as densidades das bactérias do complexo

laranja foram significativamente maiores nas faixas etárias de 3 a 7 anos para *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *P. nigrescens*, e de 8 a 12 anos para *C. rectus*

**Conclusão.** Os resultados confirmam que crianças e adolescentes com síndrome de Down apresentam maior suscetibilidade à doença periodontal e maior prevalência e densidade de patógenos periodontais responsáveis pelo estabelecimento e o agravamento da doença periodontal.

**Palavras-chave:** Síndrome de Down; Doenças Periodontais; Bactérias; Hibridização In Situ Fluorescente.

## INTRODUÇÃO

A síndrome de Down (SD) é a desordem genética resultante de uma trissomia no cromossoma 21, que afeta de 1 a 600 a 1 a 1000 nascidos vivos<sup>1</sup>. A doença periodontal é frequentemente observada em indivíduos com SD, sendo que em crianças com a síndrome, as alterações no tecido gengival são consideradas freqüentes e de acometimento precoce<sup>2-6</sup>. O aumento da prevalência e da gravidade desta patologia em pessoas com SD pode ser atribuído a fatores como dificuldade motora para realizar higiene bucal, imunodeficiência, e colonização precoce e elevada por periodontopatógenos<sup>7</sup>.

A doença periodontal compreende um grupo de condições que afetam a gengiva, o ligamento periodontal, o cemento, o osso alveolar e as estruturas teciduais que suportam os dentes<sup>8</sup>. De origem infecciosa, esta patologia inicia-se com o crescimento de bactérias na região do sulco gengival, colonizado principalmente por bactérias Gram-negativas, anaeróbias e microaerófilas, que se associam de forma não aleatória no interior da placa bacteriana. Algumas das principais espécies periodontopatogênicas encontradas são: *Aggregatibacter*

*actinomycescomitans*; *Porphyromonas gingivalis*; *Prevotella nigrescens*; *Fusobacterium nucleatum*; *Treponema denticola*; *Campylobacter rectus*; *Prevotella intermedia*; e *Tannerella forsythia*<sup>8-11</sup>. Dentre os grupos formados pela associação bacteriana, o complexo laranja, constituído pelas espécies *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *C. rectus*, e o complexo vermelho, composto por *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*, compreendem os principais agentes etiológicos da doença periodontal responsáveis pela periodontite crônica e intimamente relacionados com a presença de sangramento à sondagem e com outras manifestações clínicas da doença<sup>12</sup>.

Em estudo anterior com adolescentes com SD, foi observada composição microbiana alterada da placa subgingival, com maior frequência de *A. actinomycescomitans*, *Capnocytophaga* e *P. Gingivalis*<sup>13</sup>. Títulos de anticorpos para *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *Selenomonas sputigena*, *A. actinomycescomitans* e *Streptococcus mitis* apresentaram uma correlação positiva com as manifestações clínicas da doença periodontal em crianças com SD em fase de dentição decídua<sup>5</sup>. Outros resultados sugeriram que crianças com SD apresentam uma colonização muito precoce de vários periodontopatógenos com maior prevalência para as espécies *P. gingivalis*, *Bacteroides forsythus* e *T. denticola*<sup>2</sup>. Na microbiota subgingival de crianças, adolescentes e adultos jovens (de 8 a 28 anos) com SD, observou-se a presença das espécies *T. forsythia* e *Actinomyces naeslundii* em todas as faixas etárias; nas idades mais avançadas, observou-se também a presença de *P. gingivalis*, *A. actinomycescomitans*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *C. sputigena* e *P. Micros*<sup>6</sup>.

A presença de periodontopatógenos é fundamental para o desenvolvimento da doença periodontal, independentemente das alterações

imunológicas associadas com a SD<sup>14</sup>. Assim, investigar a colonização de bactérias periodontais entre crianças e adolescentes com SD tem particular importância para a avaliação dos riscos à doença periodontal, e pode, conseqüentemente, contribuir para a eficácia da prevenção e do tratamento da doença. Novas técnicas de microbiologia molecular podem fornecer ferramentas de rastreamento rápido, que têm se tornado uma abordagem de diagnóstico importante na Odontologia preventiva<sup>9</sup>. A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (*FISH*) fornece informações sobre a morfologia, o número e a distribuição espacial de vários micro-organismos<sup>15</sup>, inclusive de bactérias periodontopatogênicas<sup>16-17</sup>. Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar qualitativa e quantitativamente oito espécies de bactérias periodontopatogênicas na saliva de crianças e adolescentes com síndrome de Down em comparação com crianças e adolescentes sem a síndrome.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo transversal observacional foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora em 28 de novembro de 2011 (Parecer nº 383/2011). Os pais e/ou responsáveis pelas crianças e adolescentes que atenderam aos critérios de inclusão consentiram na participação do menor no estudo por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

### *Amostra*

Foram selecionados trinta crianças e adolescentes com SD assistidos da Associação de Pais e Amigos do Excepcional – APAE, e trinta crianças e adolescentes sem a síndrome, selecionados entre alunos na mesma faixa etária

matriculados em instituição de ensino do município de Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil. Para serem incluídos no estudo, os participantes com ou sem SD deveriam ter idade entre três e 12 anos e estar em fase de dentição decídua ou mista. Para efeito do cálculo de idade foi considerado o último aniversário. Crianças e adolescentes com SD deveriam ter diagnóstico comprovado pelo cariótipo, incluído na documentação da APAE, e não apresentar deficiência intelectual que impossibilitasse o exame clínico. Não foram incluídos crianças e adolescentes em tratamento ortodôntico e/ou em uso de medicação antimicrobiana. Os participantes foram distribuídos em dois grupos, da seguinte forma: grupo SD – crianças e adolescentes com SD; e grupo ND – crianças e adolescentes sem a síndrome.

#### *Condição periodontal*

Após a coleta dos dados, a condição periodontal foi avaliada por meio do índice de sangramento à sondagem<sup>18</sup> e a versão modificada do índice de placa de Silness e Løe (1964)<sup>19</sup>. Para cada participante, a dentição foi dividida em seis sextantes denominados de superior direito, superior anterior, superior esquerdo, inferior direito, inferior anterior e inferior esquerdo. Para representar cada sextante, foram examinados dentes índice adotados em estudos anteriores que incluíram os seguintes dentes decíduos: incisivo central superior direito e o incisivo central inferior esquerdo (51 e 71, respectivamente), e os primeiros e segundos molares de cada sextante (54, 55, 64, 65, 74, 75, 84, 85). Quando um destes dentes estivesse ausente, deveria ser substituído pelo seu sucessor permanente ou por outro dente do mesmo sextante<sup>20</sup>.

O sangramento após a sondagem foi registrado dez segundos após a sondagem nas faces mesial, distal, vestibular, palatina ou lingual dos dentes índices

utilizando-se sonda periodontal (PCP-UNC 15, Hu-Friedy<sup>®</sup>, Chicago, IL, EUA), de acordo com um padrão dicotômico – presença (+) ou ausência (-). A fim de calcular a prevalência de gengivite nos grupos, adotou-se como critério diagnóstico, a presença de pelo menos uma área sangrante<sup>18</sup>.

O índice de placa foi avaliado utilizando-se sonda periodontal (PCP-UNC 15, Hu-Friedy<sup>®</sup>, Chicago, IL, USA) e espelho bucal plano. Registrou-se a presença de placa bacteriana nas superfícies vestibular, lingual, mesial e distal dos dentes índices, segundo o índice de Silness e Løe (1964)<sup>19</sup>, no qual são atribuídos escores de 0 a 3, da seguinte forma:

- 0 – ausência de depósitos de placa bacteriana na região cervical;
- 1 – visualização da placa bacteriana através de sua remoção com a sonda periodontal;
- 2 – visualização da placa bacteriana a olho nu;
- 3 – placa bacteriana com acúmulo abundante na superfície dental e interdental.

Antes da coleta dos dados, a calibração intraexaminador e interexaminador foi verificada pelo coeficiente *kappa* de Cohen, que indicou concordância intraexaminador ( $\kappa = 0,93$ ) e interexaminador ( $\kappa = 0,92$ ) para o índice de sangramento a sondagem.

#### *Detecção, identificação e quantificação de bactérias orais periodontopatogênicas*

Amostra de saliva não estimulada foi coletada de cada voluntário depois do exame clínico, com pipeta Pasteur de plástico descartável (Qingdao AMA Co., Ltda, Shandong, China). A coleta foi realizada entre 8h00min e 12h00min<sup>21,22</sup>, pelo menos uma hora depois de se alimentar, escovar os dentes ou enxaguar a boca<sup>22</sup>.

Após a coleta, 180 µL de saliva foram transferidos, com auxílio de pipeta automática, para um tubo de microcentrifuga contendo 20 µL de solução de paraformaldeído a 20%. As amostras foram mantidas refrigeradas e transportadas imediatamente para o Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos da UFJF. As amostras fixadas foram armazenadas a -20°C para análise microbiológica.

A identificação e a quantificação dos micro-organismos orais foram determinadas pela técnica de *FISH*. As amostras foram fixadas em paraformaldeído a 20% (concentração final de 2%) e filtradas através de filtro branco de policarbonato Milipore de 0,22 µm. Foram utilizados os marcadores Cy3 em oligonucleotídeos RNAr (Operon Technologies®, Alameda, Califórnia, EUA) para a identificação dos micro-organismos orais (Tabela 1).

<b>Tabela 1.</b>
------------------

Posteriormente, as amostras foram coradas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para contagem da densidade bacteriana total. Um marcador controle negativo (5'-3CCTAGTGACGCCGTCGAC-3'), que não possui especificidade para nenhum grupo bacteriano, foi utilizado para a avaliação da eficiência da hibridização<sup>29</sup>. Os filtros foram, então, divididos em dez partes, uma para cada sonda específica e a décima parte para a sonda negativa. Cada pedaço de filtro foi colocado em uma lâmina de vidro revestida com parafilme e foi coberto com 30 µL da solução de hibridização em uma concentração final de 2,5 ng/µL da sonda de oligonucleotídeo. A solução de hibridização foi composta por 0,9 M de NaCl, 20 mM de Tris-HCL (pH 7,4), dodecil sulfato de sódio (DSD) a 0,01% e a concentração de formamida específica para cada bactéria. A amostra foi incubada em uma estufa a

42°C por uma noite. Após a hibridização, a amostra foi transferida para uma solução de lavagem, contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético EDTA, DSD a 0,01% e uma concentração de NaCl apropriada para a sonda específica, e então a amostra foi incubada a 48°C por 15 minutos. As células bacterianas foram coradas com 2 µg/ mL de DAPI para que pudesse ser realizada a contagem da densidade bacteriana total. Cada pedaço do filtro foi imerso em etanol 80% (v/v) por três vezes e deixado para secar. Finalmente, a lâmina foi montada utilizando glicerol e Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) na proporção de 4:1. As células bacterianas totais e de cada espécie foram contadas utilizando-se um microscópio de epifluorescência Olympus BX60 equipado com o filtro 41007a para o marcador Cy3 e o filtro 31000 para DAPI, no aumento de 1000X.

A contagem foi realizada em dez campos aleatórios por um único pesquisador treinado por pesquisador experiente. O número final de bactérias foi calculado pela multiplicação das diluições realizadas durante o tratamento da amostra. O percentual de cada espécie em relação à contagem das células bacterianas totais foi calculado. Os resultados foram expressos em céls/mL.

### *Análise estatística*

Os dados foram organizados em um banco de dados no programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* – SPSS – versão 15.0 para *Windows*. As variáveis categóricas foram descritas segundo a distribuição de frequência. Medidas descritivas (média, mediana, desvio-padrão, e valores mínimo e máximo) foram usadas para descrever as variáveis contínuas, relativas aos micro-organismos pesquisados. O teste qui-quadrado foi usado para análise das variáveis categóricas. O teste *U* de Mann-Whitney foi usado para amostras independentes

para análise das variáveis contínuas entre os grupos. Em todas as análises, o nível de significância adotado foi de 5%.

## RESULTADOS

A amostra total incluiu sessenta crianças e adolescentes com idade entre 3 e 12 anos, residentes no município de Juiz de Fora. A Tabela 2 apresenta a caracterização da amostra segundo as variáveis idade e sexo.

**Tabela 2.**

As Tabelas 3 e 4 apresentam os dados obtidos no exame clínico relativos à condição periodontal avaliada através do índice de sangramento à sondagem e do índice de placa. No grupo SD foi observada uma porcentagem mais alta, significativa, de crianças e adolescentes com sangramento à sondagem em comparação com o grupo ND ( $P = 0.037$  – Tabela 3). O índice de placa médio não diferiu entre os grupos ( $P = 0.516$  – Tabela 4).

**Tabela 3.**

**Tabela 4.**

A Figura 1 apresenta a frequência de crianças e adolescentes dos grupos SD e ND com as respectivas espécies de bactérias periodontopatogênicas. A frequência dos grupos SD e ND juntos em relação às bactérias periodontopatogênicas variou de 80 a 100% em ambos os grupos.

Figura 1.

As medidas descritivas da densidade das oito bactérias na saliva (cél/mL X 10<sup>8</sup>) obtidas para os dois grupos são apresentadas na Tabela 5. O teste *U* de Mann-Whitney demonstrou maior densidade de bactérias na saliva para as espécies *C. rectus*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* no grupo SD.

Tabela 5.

A Tabela 6 apresenta o resultado da comparação das médias dos postos das densidades das bactérias do complexo laranja e do complexo vermelho determinadas na saliva entre crianças e adolescentes dos grupos SD e ND, divididos em duas faixas etárias. O resultado do teste *U* de Mann-Whitney demonstrou diferença estatisticamente significativa na densidade das bactérias do complexo laranja, a saber, *Prevotella intermedia* ( $P = 0.001$ ), *Fusobacterium nucleatum* ( $P = 0.029$ ), e *Prevotella nigrescens* ( $P = 0.006$ ) na faixa etária de 3-7 anos, e da bactéria *C. rectus* ( $P = 0.045$ ), na faixa etária de 8 a 12 anos. Os valores foram superiores para o grupo SD.

Tabela 6.

## DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado para avaliar qualitativa e quantitativamente a presença, na saliva, de bactérias periodontopatogênicas

importantes para o estabelecimento da doença periodontal em crianças e adolescentes com síndrome de Down. Ambos os grupos foram semelhantes em relação à distribuição por idade e sexo. A compreensão e a cooperação das crianças e dos adolescentes foram um dos critérios de inclusão, uma vez que o exame clínico e a coleta de saliva poderiam ser particularmente difíceis para indivíduos com SD com grave deficiência intelectual.

Os resultados relativos à condição periodontal mostraram que o grupo SD apresentou uma porcentagem significativamente mais alta de inflamação periodontal, estimada pelo índice de sangramento à sondagem, em concordância com estudos anteriores em que se observou uma maior suscetibilidade à doença entre crianças e adolescentes com a síndrome<sup>2-7</sup>. A maior prevalência e gravidade desta patologia podem ser atribuídas a fatores como, imunodeficiência<sup>3,4</sup>, colonização precoce e elevada por periodontopatógenos<sup>2,5,6</sup> além de dificuldade motora para realizar higiene bucal, com conseqüente acúmulo de placa bacteriana<sup>3,7,14</sup>. Entretanto, o índice de placa bacteriana médio, do presente estudo, foi baixo e semelhante entre os grupos, confirmando dados anteriormente relatados<sup>4</sup>.

Embora as diferenças na microbiota periodontopatogênica possam justificar a maior suscetibilidade à doença periodontal frequentemente observada em indivíduos com SD, poucos estudos descreveram as espécies bacterianas associadas a esta doença em crianças e adolescentes com a síndrome. No presente estudo, a avaliação microbiológica demonstrou uma alta prevalência (de 80 a 100%) das oito espécies de periodontopatógenos na amostra total. No grupo SD, a prevalência variou de 96,7% (*C. rectus*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum* e *P. intermedia*) a 100% (*A. actinomycetemcomitans*, *P. nigrescens* e *T. forsythia*), frequência superior aquelas relatadas em estudo prévio<sup>2,5,6,13,14</sup>.

Estes resultados divergentes podem ser atribuídos aos métodos empregados, uma vez que este parece ter sido o primeiro estudo a utilizar a técnica de *FISH* para detectar, identificar e quantificar bactérias periodontopatogênicas na saliva de indivíduos com SD. Esta técnica fornece resultados quantitativos diretos, sem uma cultura prévia, com visualização e contagem das células microbianas individualmente pelas informações da microscopia, além de ser um método rápido e objetivo<sup>15,16,28</sup>. A técnica de *FISH* permitiu observar densidades significativamente maiores das espécies *C. rectus*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* no grupo SD. Estes resultados são semelhantes aos de estudos anteriores que utilizaram outros métodos para identificação de periodontopatógenos em crianças e adolescentes com SD comparados a um grupo controle. Foi sugerido que uma colonização precoce de bactérias periodontopatogênicas entre crianças com SD resulta na alteração da microbiota da cavidade bucal e, conseqüentemente, no desenvolvimento de doença periodontal em idades mais baixas<sup>5,6,13</sup>.

Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi encontrada nas densidades de *A. actinomycetemcomitans*, resultado semelhante ao obtido anteriormente<sup>2</sup>. Por outro lado, outros autores demonstraram uma relação entre a maior colonização por esta espécie e a maior frequência de alteração periodontal em crianças e adolescentes com síndrome de Down<sup>5,6,13,14</sup>. A possibilidade de a espécie *A. actinomycetemcomitans* ser detectada em sítios periodontalmente saudáveis foi anteriormente sugerida<sup>2,9</sup> e pode explicar o resultado obtido no grupo ND, o qual apresentou menor frequência de sítios sangrantes, e sugere uma discussão sobre *A. actinomycetemcomitans* ser um agente definitivo no estabelecimento precoce de doença periodontal na população com SD.

Resultado importante do presente estudo refere-se à significativa maior densidade das bactérias do complexo laranja no grupo SD, nas faixas etárias de 3 a 7 anos (*F. nucleatum*, *P. Intermedia* e *P. nigrescens*) e de 8 a 12 anos (*C. rectus*), que indica uma maior colonização de importantes bactérias periodontopatogênicas entre crianças de mais baixa idade. As bactérias do complexo laranja precedem e preparam o meio para a colonização dos micro-organismos que compõem o complexo vermelho, incluem-se entre aquelas consideradas como os principais agentes etiológicos da doença periodontal, e estão associadas com a presença de sangramento à sondagem<sup>12</sup>, determinado em maior frequência no grupo SD. A avaliação por faixa etária dá idéia de sucessão ecológica e conseqüentemente substituição de espécies. Embora por faixa etária não tenha havido diferença significativa entre os grupos para as bactérias do complexo vermelho, somente *T. forsythia* não diferiu significativamente quando a avaliação foi realizada sem divisão por faixa etária. Desta forma, sugere-se que o complexo laranja favoreceu uma maior colonização de duas das três bactérias do complexo vermelho (*P. gingivalis* e *T. denticola*).

Apesar de ter sido usada uma amostra de conveniência, os resultados deste estudo confirmam que crianças e adolescentes com síndrome de Down têm uma maior suscetibilidade à alteração periodontal e maiores prevalência e densidade de alguns periodontopatógenos. Estes resultados são consistentes com a ideia de que, nestes indivíduos, certas bactérias periodontopatogênicas, assim como a associação específica entre determinadas espécies, podem contribuir para o aumento da prevalência e da gravidade da doença periodontal<sup>30</sup>, e levanta a questão de se saber qual a razão para esta alta colonização em crianças e adolescentes com

SD não investigada no presente estudo. Apesar disso, os dados obtidos acrescentam informações importantes sobre a microbiota da doença periodontal entre crianças e adolescentes com síndrome de Down, que sugerem a realização de exame periodontal regular para o estabelecimento de diagnóstico precoce da doença e implementação de medidas preventivas para as necessidades específicas desses indivíduos.

### **Bullet points**

#### **Porque este artigo é importante para odontopediatras**

- Crianças e adolescentes com síndrome de Down apresentam maior suscetibilidade à doença periodontal quando comparadas com crianças e adolescentes sem a síndrome.
- Crianças e adolescentes com síndrome de Down apresentam densidades significativamente maiores das espécies *C. rectus*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* quando comparadas com crianças e adolescentes sem a síndrome.
- Crianças e adolescentes com síndrome de Down devem ser submetidos a exame periodontal regular para o diagnóstico precoce da doença periodontal e implementação de medidas preventivas para as suas necessidades específicas.

### **REFERÊNCIAS**

1. Desai SS, Fayetteville NY. Down's syndrome: a review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1997; 84: 279-285.

2. Amano A, Kishima T, Kimura S et al. Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. *J Periodontol* 2000; 71: 249-255.
3. Frydman A, Nowzari H. Down syndrome-associated periodontitis: a critical review of the literature. *Compend Contin Educ Dent* 2012; 33: 356-361.
4. Mathias MF, Simionato MRL, Guaré RO. Some factors associated with dental caries in the primary dentition of children with Down syndrome. *Eur J Paediatr Dent* 2011; 12: 37-42.
5. Morinushi T, Lopatin DE, Van Poperin N. The relationship between gingivitis and the serum antibodies to the microbiota associate with periodontal disease in children with Down's Syndrome. *J Periodontol* 1997; 68: 626-31.
6. Sakellari D, Arapostathis KN, Konstantinidis A. Periodontal conditions and subgingival microflora in Down syndrome patients. A case-control study. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 684-690.
7. Shyama M, Al-Mutawa AS, Morris RE, Sugathan T, Honkala E. Dental caries experience of disabled children and young adults in Kuwait. *Community Dent Health* 2001; 18: 181-186.
8. Lyko K, Bonfim C, Benelli EM, Torres-Pereira CC, Amenábar JM. Salivary detection of periodontopathic bacteria in Fanconi's anemia patients. *Anaerobe*. 2013; 24: 32-35.
9. Kulekci G, Leblebicioglu B, Keskin F, Ciftci S, Badur S. Salivary detection of periodontopathic bacteria in periodontal health children. *Anaerobe* 2008; 14: 49-54.
10. Perez-Chaparro PJ, Gonçalves C, Figueiredo LC et al. Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. *J Dent Res* 2014; 9: 846-858.

11. Tanaka MH, Rodrigues TO, Finoti LS et al. The effect of conventional mechanical periodontal treatment on red complex microorganisms and clinical parameters in Down syndrome periodontitis patients: a pilot study. *Eur Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34: 601-608.
12. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23: 196-205.
13. Barr-Alghome M, Dahllof G, Linder L, Modeer T. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque of adolescents with Down's syndrome. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7: 244-247.
14. Martinez-Martinez RE, Loyola-Rodriguez JP, Bonilla-Garro SE et al. Characterization of periodontal biofilm in Down syndrome patients: a comparative study. *J clin pediatr dent* 2013; 37: 289-295.
15. Moter A, Göbel UB. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods* 2000; 41: 85-112.
16. Machado FC, Cesar DE, Assis VAD, Diniz CG, Ribeiro RA. Detection and enumeration of periodontopathogenic bacteria in subgingival biofilm of pregnant women. *Braz Oral Res* 2012; 26: 443-449.
17. Thurnheer T, Belibasakis GN, Bostanci N. Colonisation of gingival epithelia by subgingival biofilms in vitro: role of "red complex" bacteria. *Arch Oral Biol.* 2014; 59: 977-86.
18. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975; 25: 229-235.
19. Silness J, Løe H. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964; 22: 121-135.

20. Kaur R, Gilbert SC, Sheehy EC, Beighton D. Salivary levels of Bifidobacteria in caries-free and caries-active children. *Int J Paediatr Dent* 2013; 23: 32-38.
21. Areias C, Maia BS, Pereira ML et al. Reduced salivary flow and colonization by *mutans* streptococci in children with Down syndrome. *Clinics* 2012; 67: 1007-1011.
22. 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: 235-241.
23. Daims H, Bruhl A, Amann R, Shleifer KH, Wagner M. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* 1999; 22: 434-444.
24. Sunde PT, Olsen I, Göbel UB et al. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root filled teeth. *Microbiology* 2003; 149: 1095-1102.
25. Riep B, Edesi-Neuss L, Claessen F et al. Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1705-1711.
26. Moter A, Hoenig C, Choi BK, Riep B, Göbel UB. Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1399-1403.
27. Gmür R, Wyss C, Xue Y, Thurnheer T, Guggenheim B. Gingival crevice microbiota from Chinese patients with gingivitis or necrotizing ulcerative gingivitis. *Eur J Oral Sci* 2004; 112: 33-41.

28. Gmür R, Thurnheer T. Direct quantitative differentiation between *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in clinical specimens. *Microbiology* 2002; 148: 1379-1387.
29. Cottrell MT, Kirchman DL. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2000 ; 66: 5116-5122.
30. Klotch A, Yaskell T, Janal M et al. Subgingival microbiota in adult Down syndrome periodontitis. *J Periodontal Res* 2012; 47: 500-507.

**Tabela 1. Marcadores Cy3 em oligonucleotídeos RNAr (Operon Technologies®) para a identificação dos micro-organismos orais.**

Sonda	Especificidade	Sequência da Sonda (5'- 3')	Referência
EUB I, EUB II e EUB III	Bactéria	GCT GCC TCC CGT AGG AGT GCA GCC ACC CGT AGG TGT GCT GCC ACC CGT AGG TGT	Daims et al., 1999 <sup>23</sup>
ACAC	<i>Aggregatibacter actinomycetemomitans</i>	TCCATAAGACAGATTC'	Sunde et al., 2003 <sup>24</sup> .
B/TAFO	<i>Tannerella forsythia</i>	CGTATCTCATTTCATCCCTGTA	Sunde et al., 2003 <sup>24</sup> .
CARE	<i>Campylobacter rectus</i>	TTA AACTTATGTAAAGAAG	Riep et al., 2009 <sup>25</sup> .
POGI	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	CAATACTCGTATCGCCCGTTATTA TTC	Sunde et al., 2003 <sup>24</sup> .
TREII	<i>Treponema denticola</i>	GCTCCTTTCCTCATTTACCTTTAT'	Moter et al., 1998 <sup>26</sup> .
FUS664	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	CTTG TAGTTCCGC(C/T)TACCTC	Gmür et al., 2004 <sup>27</sup> .
Pint649	<i>Prevotella intermedia</i>	GCCGCCRCTGAASTCAAGCC	Gmür e Thurnheer, 2002 <sup>28</sup> .
Png657	<i>Prevotella nigrescens</i>	TCCGCCTGCGCTGCGTGTA	Gmür e Thurnheer, 2002 <sup>28</sup> .

Tabela 2. Características da amostra em relação a idade e sexo.

Variáveis	Amostra total (N = 60)	Grupo SD (N = 30)	Grupo ND (N = 30)	Valor de P
Idade (anos)				
Média ± desvio-padrão (anos)	6,95 ± 2,38	6,37 ± 2,50	7,53 ± 2,15	0,057 <sup>ns</sup>
Variação (anos)	3-12	3-12	4-12	
Sexo (n / %)				
Masculino (n / %)	31/51,70	17/56,70	14/43,70	0,606 <sup>ns</sup>
Feminino (n / %)	29/48,30	13/43,30	16/53,30	

\* Diferença dignificativa – Teste qui-quadrado.

ns –Diferença não significativa – Teste qui-quadrado.

Tabela 3. Resultados do índice de sangramento à sondagem.

ISS	Grupo SD (n = 30)		Grupo ND (n = 30)		Valor de <i>P</i>
	N	%	N	%	
+	11	36,70	4	13,30	0,037*
-	19	63,30	26	86,70	

ISS: Índice de sangramento à sondagem.

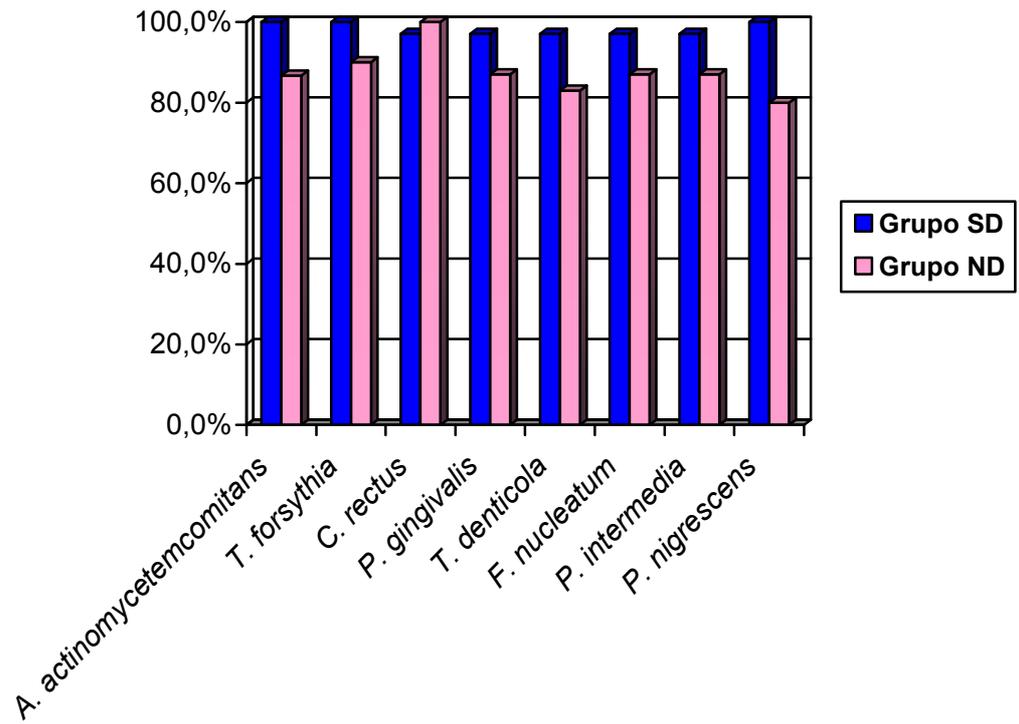
\* Diferença significativa – Teste qui-quadrado.

**Tabela 4. Resultados do índice de placa de Silness e Løe (1964).**

<b>Grupo SD</b>		<b>Grupo ND</b>		<b>Valor de P</b>
Média (Desvio-padrão)	Média dos postos	Mean (Standard deviation)	Média dos postos	0,516 <sup>ns</sup>
0,4997 (0,4419)	31,92	0,4363 (0,4428)	29,08	

IP: Índice de placa.

ns – Diferença não significativa – Teste *U* de Mann-Whitney.



**Figura 1. Frequência de crianças e adolescentes dos grupos SD e ND que apresentam as bactérias periodontopatogênicas avaliadas.**

**Tabela 5. Medidas descritivas e resultado do teste *U* de Mann-Whitney (média dos postos) para comparação da densidade de bactérias (cél/mL X 10<sup>8</sup>) na saliva de crianças e adolescentes dos grupos DS and ND.**

Bactéria	Média (Desvio padrão)		Mediana		Mínimo		Máximo		Média dos postos		Valor de <i>P</i>
	DS group	Grupo ND	Grupo SD	Grupo ND	Grupo SD	Grupo ND	Grupo SD	Grupo ND	Grupo SD	Grupo ND	
<i>A. Actinomycetemcomitans</i>	12,135 (8,8378)	16,320 (24,246)	8,775	5,850	1,350	0	40,050	85,050	34,780	26.220	0,057 <sup>ns</sup>
<i>T. forsythia</i>	17,830 (18,311)	20,865 (17,857)	12,550	14,400	0	2,700	76,500	57,600	29,270	31.730	0,584 <sup>ns</sup>
<i>C. rectus</i>	17,707 (14,395)	15,038 (21,120)	13,500	6,750	5,000	0	50,400	76,100	38,120	24.880	0,013*
<i>P. gingivalis</i>	13,140 (9,440)	10,905 (15,737)	14,400	10,800	2,700	0	57,600	50,400	35,550	25.450	0,025*
<i>T. denticola</i>	12,765 (9,303)	12,023 (19,736)	10,125	3,600	0	0	37,350	85,600	35,520	25.480	0,026*
<i>F. nucleatum</i>	19,335 (22,468)	23,760 (50,675)	11,700	4,725	0	0	83,700	245,700	36,120	24.880	0,013*
<i>P. intermédia</i>	19,710 (18,148)	12,660 (21,579)	12,150	3,600	0	0	82,800	90,000	37,880	23.120	0,001*
<i>P. nigrescens</i>	19,455 (22,922)	16,320 (24,246)	8,775	5,850	1,4	0	107,1	85,050	36,500	24.500	0,008*
DAPI	1082,330 267.585	215,000 (262,231)	1052,550	1141,000	492,750	878,400	1489,050	2282,400	26,700	34.300	0,092 <sup>ns</sup>

\* Diferença significativa – Teste *U* de Mann-Whitney.

ns – diferença não significativa – Teste *U* de Mann-Whitney.

**Tabela 6. Resultado do teste *U* de Mann-Whitney (média dos postos) para comparação da densidade na saliva de bactérias do complexo laranja e do complexo vermelho entre crianças e adolescentes do grupo SD e do grupo ND em faixas etárias de 3-7 anos e de 8-12 anos.**

Bactéria		Faixa etária de 3-7 anos			Faixa etária de 8-12 anos		
		Grupo SD	Grupo ND	Valor de <i>P</i>	Grupo SD	Grupo ND	Valor de <i>P</i>
Complexo	<i>C. rectus</i>	15,83	12,10	0,249 <sup>ns</sup>	20,79	13,93	0,045*
Laranja	<i>F. nucleatum</i>	17,03	9,95	0,029*	19,42	14,75	0,173 <sup>ns</sup>
	<i>P. intermédia</i>	18,44	7,40	0,001*	20,04	14,38	0,098 <sup>ns</sup>
	<i>P. nigrescens</i>	17,69	8,75	0,006*	19,67	14,60	0,138 <sup>ns</sup>
Complexo	<i>T. forsythia</i>	13,47	16,35	0,375 <sup>ns</sup>	17,00	16,20	0,815 <sup>ns</sup>
Vermelho	<i>P. gingivalis</i>	16,39	11,10	0,103 <sup>ns</sup>	19,71	14,58	0,133 <sup>ns</sup>
	<i>T. denticola</i>	15,78	12,20	0,270 <sup>ns</sup>	19,88	14,48	0,114 <sup>ns</sup>

\* Diferença significativa – Teste *U* de Mann-Whitney.

ns – Diferença não significativa – Teste *U* de Mann-Whitney.

## 6 REFERÊNCIAS

AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int Dent J**, London, v. 25, n. 4, p. 229-235, Dec. 1975.

AL-HABASHNEH, R. A. et al. Oral health status and reasons for not attending dental care among 12- to 16-year-old children with Down syndrome in special needs centres in Jordan. **Int J Dent Hyg**, Oxford, v. 10, n. 4 p. 259-264, Nov. 2012.

ALMEIDA, R. F. et al. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. **Rev Port Clin Geral**, Cidade do Porto, v. 22, n. 3, p. 379-390, maio/jun. 2006.

AMANO, A. et al. Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. **J Periodontol**, Indianapolis, v. 71, n. 2, p. 249-255, Feb. 2000.

ANGÉLICO, A. P. **Estudo descritivo do repertório de habilidades sociais de adolescentes com Síndrome de Down**. São Carlos (SP), 2004. 138 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Educação Especial) – Centro de Educação e Ciências Humanas da Universidade Federal de São Carlos.

AREIAS, C. et al. Reduced salivary flow and colonization by mutans streptococci in children with Down syndrome. **Clinics**, São Paulo, v. 67, n. 9, p. 1007-1011, Sep. 2012.

BAGIC, I. et al. Periodontal conditions in individuals with Down's syndrome. **Coll Antropol**, Zagreb, v. 27, n. 2, p. 75-85, Apr. 2003.

BARILLI, A. L. A. **Prevalência das doenças periodontais em pacientes com doença isquêmica coronariana aterosclerótica, em Hospital Universitário**. 2003. 92 f. Dissertação (Mestrado em Saúde na Comunidade) – Faculdade de Medicina - USP, Ribeirão Preto, 2003.

BARR-ALGHOME, A. M. et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque of adolescents with Down's syndrome. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 7, n. 4, p. 244-247, Aug. 1992.

BOBETSIS, Y. A.; BARROS, S. P.; OFFENBACHER, S. Exploring the relationship between periodontal disease and pregnancy complications. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 137, n. 10, p. 7-13, Oct. 2006.

BORRELL, L. N.; PAPAPANOU, P. N. Analytical epidemiology of periodontitis. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 32, n. 6, p. 132-158, Aug. 2005.

CARVALHO, A. C.; CAMPOS, P. S. F.; CRUSOÉ-REBELLO, I. Síndrome de Down: aspectos relacionados ao sistema estomatognático. **Rev Ciênc Méd Biol**, Salvador, v. 9, n. 1, p. 49-52, jan./abr. 2010.

CAVALCANTE, L. B., PIRES, J. R., SCAREL-CAMINAGA, R. M. Doença periodontal em indivíduos com síndrome de Down: enfoque genético. **RGO**, Porto Alegre, v. 57, n. 4, p. 449-453, out./dez. 2009.

COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scale. **Educ Psycho Measure**, Durham, v. 20, n. 1, p. 37-46, Apr. 1960.

COHEN, M. et al. Oral aspects of mongolism. **Oral Surg Med Pathol**, St. Louis, v. 14, n. 1, p. 92-107, Jan. 1961.

COTTRELL, M. T.; KIRCHMAN, D. L. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5116-5122, Dec. 2000.

DAIMS, H. et al. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. **Syst Appl Microbiol**, Stuttgart, v. 22, n. 3, p. 434-444, Sep. 1999.

DAVIDOVICH, E. et al. A comparison of the sialochemistry, oral pH, and oral health status of Down syndrome children to healthy children. **Int J Paediatr Dent**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 235-241, July 2010.

DEL'DUCA, A.; CESAR, D. E. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) como opção de ferramenta em ecologia microbiana aquática. **Bol Soc Bras Limn**, Campinas, v.36, n. 1, p. 6-9, maio 2007.

DELONG, E.F.; WICKHAM, G.S.; PACE, N.R. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. **Science**, Washington, v. 243, n. 4896, p. 1360-1363, Mar. 1989.

DESAI, S.S; FAYETTEVILLE, N. Y. Down's syndrome: a review of the literature. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.84, n. 3, p. 279-285, Sep.1997.

ETO, F. S.; RASLAN. S. A.; CORTELLI, J. R. Características microbianas na saúde periodontal. **Rev biociênc**, Taubaté, v.9, n.2, p.45-51, abr-jun. 2003.

FIORATI, S. M.; SPÓSITO, R. A.; BORSATTO, M. C. Prevalência de cárie dentária e doença periodontal em pacientes com síndrome de Down. **Odonto**, São Bernardo do Campo, v. 3. n. 2, p. 58-62, jul./dez. 1999.

FRYDMAN, A.; NOWZARI, H. Down syndrome-associated periodontitis: a critical review of the literature. **Compend Contin Educ Dent**, Los Angeles, v. 33, n. 5, p. 356-361, May 2012.

GIOVANNONI, S. J. et al. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. **J Bacteriol**, Baltimore, v. 170, n. 2, p. 720-726, Feb. 1988.

GMUR, R; THURNHEER T. Direct quantitative differentiation between *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in clinical specimens. **Microbiology**, New York, v. 148, n. 5, p.1379-1387, May 2002.

GMUR, R. et al. Gingival crevice microbiota from Chinese patients with gingivitis or necrotizing ulcerative gingivitis. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v.112, n. 1, p. 112: 33-41, Feb. 2004.

GONÇALVES, S. S. et al. Levantamento das condições de cárie e doença periodontal na associação de portadores da síndrome em Teresópolis. **Rev Odontol Univ Cid São Paulo**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 19-24, jan./abr. 2010.

GREENSTEIN, G.; CATON, J.; POLSON, A. M. Histologic characteristics associated with bleeding after probing and visual signs of inflammation. **J Periodontol**, Indianapolis, v. 52, n. 8, p. 420-425, Aug.1981.

HAFFAJEE, A. D. et al. Microbial complexes in supragingival plaque. **Oral microbial Immunol**, Copenhagen, v. 23, n. 3, p.196-205, Feb. 2008.

HARIRIAN, H. et al. Microbial analysis of subgingival plaque sample compared to that whole saliva in patients with periodontitis. **J Periodontol**, Indianapolis, v. 85, n. 6, p. 819-828, June 2014.

JEWETT, A. et al. Induction of apoptotic cell death in peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells by an oral bacterium, *Fusobacterium nucleatum*. **Infect Immun**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1893-1898, Apr. 2000.

KAMINKER, P.; ARMANDO, R. Síndrome de Down. Segunda parte: estudios genéticos y función del pediastra. **Arch Argent Pediatr**, Buenos Aires, v. 106, n. 4, p. 334-340, jul./ago. 2008.

KAUR, R; SHEEHY, E.C; BEIGHTIN, D. Salivary levels of Bifidobacteria in caries-free and caries-active children. **Int J Paediatr Dent**, Oxford, v. 23, n.1, p. 32-38, Jan. 2013.

KLOTCH, A. et al. Subgingival microbiota in adult Down syndrome periodontitis. **J Periodontal Res**, Copenhagen, v.47, n. 4, p. 500-507, Aug. 2012.

KULEKCI, G. et al. Salivary detection of periodontopathic bacteria in periodontal health children. **Anaerobe**, London, v. 14, n. 1, p. 49-54, Feb. 2008.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Washington, v. 33, n. 1, p. 159-174, Mar. 1977.

LEMOS, S. S. **Detecção e quantificação de bactérias em dentes decíduos com necrose pulpar por meio da técnica de hibridização in situ fluorescente (FISH)**. 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 1048 p.

LOUREIRO, C. A.; COSTA, F. O.; COSTA, J. E. The impact of periodontal disease on the quality of life of individuals with Down syndrome. **Down's Syndr Res Pract**, London, v. 12, n. 1, p. 50-54, July 2007.

LYKO, K. et al. Salivary detection of periodontopathic bacteria in Fanconi's anemia patients. **Anaerobe**, London, v. 24, p. 32-35, Sep. 2013.

MACHADO, F. C. et al. Detection and enumeration of periodontopathogenic bacteria in subgingival biofilm of pregnant women. **Braz Oral Res**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 443-449, Sep./Oct. 2012.

MARSH, P.; MARTIN, M. 2005. **Microbiologia Oral**. Livraria Santos Editora: São Paulo, 2005.

MARTINEZ-MARTINEZ R. E. et al. Characterization of periodontal biofilm in Down syndrome patients: a comparative study. **J clin pediatr dent**, Birmingham, v. 37, n. 4, p. 289-295, 2013.

MATHIAS, M. F.; SIMIONATO, M. R. L.; GUARÉ, R. O. Some factors associated with dental caries in the primary dentition of children with Down syndrome. **Eur J Paediatr Dent**, Carimate, v. 12, n. 1, p. 37-42, Mar. 2011.

MESSIAS, L. P. A. **Ocorrência de micro-organismos periodontopatogênicos e vírus herpéticos na cavidade bucal de pacientes portadores de síndrome de Down**. Araçatuba (SP), 2009. 88 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação de Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, 2009.

MODÉER, T., BARR, M.; DAHLLOF, G. Periodontal disease in children with Down's syndrome. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v. 98, n. 3, p. 228-234, Jun. 1990.

MORAES, M. E. L. et al. Dental age in patients with Down syndrome. **Braz Oral Res**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 259-264, July/Sep. 2007.

MORGAN, J. Why is periodontal disease more prevalent and more severe in people with Down syndrome? **Spec Care Dentist**, Chicago, v. 27, n. 5, p. 169-201, Sep./Oct. 2007.

MORINUSHI, T.; LOPATIN, D. E.; VAN POPERIN, N. A comparison of the gingival health of children with Down syndrome to healthy children residing in an institution. **Spec Care Dentist**, Indianapolis, v. 26, n. 1, p. 13-19, July 2006.

MORINUSHI, T.; LOPATIN, D. E.; VAN POPERIN, N. The relationship between gingivitis and the serum antibodies to the microbiota associate with periodontal

disease in children with Down's Syndrome. **J Periodontol**, Indianapolis, v. 68, n. 7, p. 626-31, July 1997.

MOTER, A.; GÖBEL, U. B. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. **J Microbial Methods**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 85-112, July 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Levantamentos básicos em saúde bucal**. 4. ed. São Paulo: Santos, 1999.

OLIVEIRA, A. C.; LUZ, C. L. C. F.; PAIVA, S. M. O papel da saúde bucal na qualidade de vida do indivíduo com síndrome de Down. **Arq Odontologia**, Belo Horizonte, v. 43, n. 4, p. 162-168, out./dez. 2007.

PEREZ-CHAPARRO, P. J. et al. Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. **J Dent Res**, Washington, v. 9, n. 93, p. 846-58, Sep. 2014.

PROCEEDING OF THE 1966 WORLD WORKSHOP IN PERIODONTICS. Landsdownw, Virginia, July 13-17. **Ann Periodontol**, Chicago, v. 1, p. 1-947, 1966.

REULAND-BOSMA, W.; DJIK, J.; WEELE, L. Absence of a specific subgingival microflora in adults with Down's syndrome. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 28, n. 11, p. 1004-1009, Nov. 2001.

REULAND-BOSMA, W.; DJIK, J.; WEELE, L. Experimental gingivitis around deciduous teeth in children with Down's syndrome. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 13, n. 4, p. 294-300, Apr. 1986.

RIEP B. et al. Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? **J Clin Microbiol**, Washington, v. 47, n. 6, p. 1705-1711, June 2009.

SAKELLARI, D.; ARAPOSTATHIS K. N.; KONSTANTINIDIS, A. Periodontal conditions and subgingival microflora in Down syndrome patients. A case-control study. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 32, n. 1, p. 684-690, Jan. 2005.

SANTOS, F. A. S. et al. Condições periodontais de pacientes portadores de alterações cardiovasculares em um hospital público de Maceió-Al. **R Periodontia**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 67-71, março 2010.

SCALIONI, F. A. R. **Experiência de cárie dentária e bactérias cariogênicas detectadas e quantificadas pelo método da hibridização in situ fluorescente na saliva de crianças com síndrome de Down**. 2013. 85 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

SCHILLINGER, C. et al. Co-localized or randomly distributed? Pair cross correlation of in vivo grown subgingival biofilm bacteria quantified by digital image analysis. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 7, n. 5, p. 321-330, May 2012.

SHADDOX, L. M. et al. Microbiological characterization in children with aggressive periodontitis. **J Dent Res**, Chicago, v. 91, n. 10, p. 927-933, Oct. 2012.

SHYAMA, M. et al. Dental caries experience of disabled children and young adults in Kuwait. **Community Dent Health**, London, v.18, n.3, p.181-186, Sep. 2001.

SILNESS, J.; LÖE, H. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v. 22, p.121-135, 1964.

SILVA, N. L. P.; DESSEN, M. A. Síndrome de Down: etiologia, caracterização e impacto familiar. **Interação Psicol**, Curitiba, v. 6, n. 2, p.167-176, 2002.

SOCRANSKY, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 25, n. 2, p. 134-144, Feb. 1998.

SUNDE, P. T. et al. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root filled teeth. **Microbiology**, New York, v.149, n. 5, p.1095-1102, May 2003.

SUZART, I. G. F. et al. Comparação de critérios que determinam o diagnóstico clínico da doença periodontal. **Rev Odonto Ciênc**, Porto Alegre, v. 21, n. 51, p.77-81, jan./mar. 2006.

TANAKA, M. H. et al. The effect of conventional mechanical periodontal treatment on red complex microorganisms and clinical parameters in Down syndrome periodontitis patients: a pilot study. **Eur Clin Microbiol Infect Dis**, Berlin, v. 34, n. 3, p. 601-608, Nov. 2015.

TANNER, A. C.; IZARD, J. *Tanerella forsythia*, a periodontal pathogen entering the genomic era. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 42, n, 1, p. 88-113, Oct. 2006.

THURNHEER T; BELIBASAKIS G.N.; BOSTANCI G.N. Colonisation of gingival epithelia by subgingival biofilms in vitro: role of "red complex" bacteria. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.59, n.9, p. 977-986, 2014.

TRETIN, M. S. et al. Prevalence of periodontal disease in special needs patients at APAE-PF/RS and the effect of local prevention programs. **Braz J Oral Sci**, Piracicaba, v. 9, n. 4, p. 475-480, Oct./Dec. 2010.

WAGNER, M.; HONRY, M.; DAIMSZ, H. Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. **Curr Opin Microbiol**, New York, v. 6, n. 3, p. 302–309, June 2003.

WENNSTRÖM, J. et al. Some periodontal tissue reactions to orthodontic tooth movement in monkeys. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 14, n. 3, p. 121-129, Mar. 1987.

XAVIER, A. C. V. et al. Condição periodontal de crianças e adolescentes com diabetes melito tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 53, n.3, p. 348-54, abr. 2009.

## APÊNDICE

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HU/UFJF  
JUIZ DE FORA – MG – BRASIL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

Pesquisador Responsável: Rosângela Almeida Ribeiro

Endereço: Rua Santo Antônio, nº. 1098, aptº. 204 – Primeiro Bloco

CEP: 36016-210 – Juiz de Fora – MG

Fone: (32) 3213-5714

E-mail: [ralmeida@powerline.com.br](mailto:ralmeida@powerline.com.br)

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

##### Consentimento pós-informação para participação em projeto de pesquisa

Seu(sua) filho(a) está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “ESPÉCIES DE BACTÉRIAS ORAIS CARIOGÊNICAS DETECTADAS, IDENTIFICADAS E QUANTIFICADAS PELO MÉTODO DA HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE NA SALIVA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM SÍNDROME DE DOWN”. As informações aqui contidas foram fornecidas pela pesquisadora Rosângela Almeida Ribeiro para firmar acordo por escrito, mediante o qual o(a) Sr.(a) responsável legal pela criança ou do adolescente selecionado para a pesquisa, autoriza sua participação, com conhecimento total da natureza dos procedimentos a serem realizados.

1. **Objetivo principal:** Detectar, identificar e quantificar bactérias orais na saliva de crianças e adolescentes com síndrome de Down em comparação com seus irmãos.
2. **Justificativa:** Os micro-organismos associados à cárie dentária em indivíduos com síndrome de Down necessitam ser identificados por meio de investigações com técnicas melhores ainda não realizadas.

3. **Metodologia/Procedimentos:** Exame dos dentes e coleta de saliva.
4. **Benefícios:** Os resultados do estudo permitirão instituir melhor abordagem de prevenção e controle da cárie dentária em pessoas com síndrome de Down.
5. **Riscos esperados:** Risco mínimo. A coleta de saliva é um procedimento não-invasivo, sendo feito com rolete de algodão. Há um risco mínimo de desconforto. O risco de engolir o algodão será prevenido pelo uso de fio dental para amarrar o rolete de algodão durante sua permanência na boca.
6. **Obrigação dos responsáveis:** Comparecer à consulta agendada para os exames e coleta de saliva.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido(a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador

A pesquisadora irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Nem o seu nome nem o de seu(sua) filho(a) ou o material que indique sua participação serão liberados sem a sua permissão.

Nem o(a) Sr.(a) nem seu(sua) filho(a) serão identificados em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pela pesquisadora responsável, na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, e a outra será fornecida a você.

Caso haja danos decorrentes dos riscos previstos, a pesquisadora assumirá a responsabilidade pelos mesmos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado(a) dos objetivos do estudo "ESPÉCIES DE BACTÉRIAS ORAIS CARIOGÊNICAS DETECTADAS, IDENTIFICADAS E QUANTIFICADAS PELO MÉTODO DA HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE NA SALIVA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM SÍNDROME DE DOWN", de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_ .

Nome do(a) responsável pelo menor: \_\_\_\_\_

Assinatura do(a) responsável pelo menor: \_\_\_\_\_

Número do Documento de Identidade do(a) responsável pelo menor: \_\_\_\_\_

Nome da pesquisadora: \_\_\_\_\_

Assinatura da pesquisadora: \_\_\_\_\_

Número do Documento de Identidade da pesquisadora: \_\_\_\_\_

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o CEP HU – Comitê de Ética em Pesquisa HU/UFJF.

Hospital Universitário Unidade Santa Catarina

Prédio da Administração, Sala 27

CEP: 36036-110

E-mail: **cep.hu@ufjf.edu.br**

## ANEXO A

## PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Página 1 de 3



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP-HU CAS/UFJF



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

Parecer nº 383/2011

**Protocolo CEP-UFJF:** 167-420-2011 **FR:** 476873 **CAAE:** 0127.0.420.000-11**Projeto de Pesquisa:** Espécies de bactérias orais cariogênicas e periodontopatogênicas detectadas, identificadas e quantificadas pelo método da hibridização in situ fluorescente na saliva de crianças e adolescentes com Síndrome de Down.**Versão do Protocolo e Data:** 18/11/2011**Grupo:** III**Pesquisador Responsável:** Rosângela Almeida Ribeiro**Pesquisadores Participantes:** Flávia Almeida Ribeiro Scalioni, Camila Faria Carrada, Fernanda Campos Machado.**Instituição:** Universidade Federal de Juiz de Fora**Matéria para análise:** Folha de Rosto; Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; Orçamento Financeiro; Comprovante de currículo dos pesquisadores envolvidos**Sumário/comentários do protocolo:**

**Justificativa:** A síndrome de Down (SD) é uma desordem genética resultante da trissomia do cromossomo 21. Representa a anomalia cromossômica mais comum da espécie humana, com uma incidência de 1:800 a 1:1000 nascimentos. Entre as manifestações bucais mais frequentemente encontradas em indivíduos com SD são citadas: boca seca devido à respiração bucal; fissura lingual e labial, protrusão lingual; macroglossia; má oclusão como a mordida aberta anterior; úlceras na mucosa; candidíase; e gengivite ulcerativa necrosante. Indivíduos com SD apresentam uma prevalência mais baixa de cárie dentária, apesar da exposição a fatores de risco como dieta cariogênica, diminuição de fluxo salivar, respiração bucal, forças oclusais desbalanceadas e pobre acesso à higiene bucal. Algumas das hipóteses sugeridas para esta baixa prevalência incluem: atraso da erupção dentária junto com a alteração da cronologia de erupção; alta frequência de hipodontia; diferenças na composição, pH, capacidade tampão e fluxo salivar e diferença na microbiota cariogênica. Por outro lado, indivíduos com SD apresentam maior prevalência e gravidade de doença periodontal. A existência de uma microbiota associada à gengivite ou periodontite em indivíduos com SD vem sendo investigada. Estudos com crianças e adolescentes evidenciaram relação entre a colonização da cavidade bucal por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, entre outros, e o desenvolvimento de perdas significativas de inserção conjuntiva e inflamação gengival. A microbiota bucal de indivíduos com SD em nosso meio necessita de melhor caracterização, o que poderia resultar em política mais aprimorada de atendimento desta população. Frente ao exposto, o presente estudo tem o objetivo de investigar espécies de bactérias orais relacionadas à cárie dentária e à doença periodontal, a fim de detectar, identificar e quantificar os níveis salivares destes micro-organismos em crianças e adolescentes com síndrome de Down em comparação com indivíduos não-sindrômicos na mesma faixa etária.

**Objetivo:** Tem como objetivo geral detectar, identificar e quantificar espécies de bactérias orais relacionadas à cárie dentária e à doença periodontal na saliva de crianças e adolescentes com síndrome de Down em comparação com indivíduos não-sindrômicos. E como objetivos específicos Detectar, identificar e quantificar os níveis salivares de S.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP-HU CAS/UFJF  
RUA CATULO BREVIGLIEI S/Nº - B. SANTA CATARINA  
36036-110- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL - Fone: 40095205

Prof.ª Dra. *Angela Maria Gollner*  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
HU CAS da UFJF

*mutans* e *S. sobrinus* por meio da técnica de *FISH* em crianças e adolescentes com síndrome de Down em comparação com irmãos não-sindrômicos, e verificar correlação entre os níveis salivares de estreptococos cariogênicos e a presença de cárie dentária nos dois grupos. É detectar, identificar e quantificar os níveis salivares de *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *C. rectus*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, e *T. denticola* por meio da técnica de *FISH* em crianças e adolescentes com síndrome de Down em comparação com irmãos não-sindrômicos, e verificar correlação entre os níveis salivares de periodontopatógenos e a presença de doença periodontal nos dois grupos.

**Metodologia:** Trata-se de um estudo observacional transversal. Serão convidados a participar do estudo crianças e adolescentes com síndrome de Down, assistidas em Instituições de apoio, e seus irmãos não-sindrômicos. Os participantes serão distribuídos em dois grupos, da seguinte forma: Grupo I – vinte crianças e adolescentes com síndrome de Down com diagnóstico devidamente comprovado por meio do exame de cariótipo. Grupo II – vinte crianças e adolescentes não-sindrômicos. Preenchido um prontuário clínico próprio com os dados de identificação, da condição dentária e da condição periodontal de todos os voluntários. Para avaliar a condição dentária, serão registrados os índices CPO-D e ceo-d, com sonda exploradora nº. 5 de ponta romba e espelho bucal plano, sob luz artificial, após secagem prévia do elemento dentário com jato de ar. O índice CPO-D mede o ataque de cárie à dentição permanente. Suas iniciais representam, respectivamente, dentes cariados (C), perdidos (P), obturados (O) e a medida de unidade, o dente (D). Os perdidos subdividem-se em extraídos (E) e com extração indicada (Ei). O índice ceo-d é o correspondente ao CPO-D para a dentição decídua. Inclui os dentes cariados (c), com extração indicada (e) e obturados (o). A condição periodontal será avaliada pelo índice gengival modificado (IGM), registrado nas superfícies vestibular e lingual de dois sítios em cada dente. Estes registros também serão realizados por um único examinador em todos os dentes presentes. O IGM consiste de um exame visual, usando escores de 0 a 4. O exame radiográfico complementar será composto por radiografias intrabucais (periapicais e interproximais) e extrabucais (panorâmica). A amostra de saliva não estimulada será coletada depois do exame clínico, com o kit Salivette® (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha). A identificação e a quantificação dos micro-organismos orais serão determinadas pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente (*Fluorescence in situ hybridization* – *FISH*). Os dados serão organizados em um banco de dados no programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* – *SPSS* – versão 12.0 para *Windows* e serão submetidos à análise descritiva da frequência absoluta e relativa das variáveis analisadas.

**Características da população a estudar:** crianças e adolescentes com síndrome de Down, assistidas em Instituições de apoio, e seus irmãos não-sindrômicos.

**Tamanho da amostra:** 40 crianças e adolescentes, sem distinção de raça, sexo, nível socioeconômico ou credo religioso.

**Relação risco x benefícios:** Atende às exigências. Consta no corpo do projeto e em anexo.

**Previsão de ressarcimento:** Atende às exigências. Consta no corpo do projeto e em anexo.

**Orçamento:** Atende às exigências. Consta no corpo do projeto e em anexo.

**Fonte de financiamento:** A responsabilidade do financiamento da pesquisa caberá ao pesquisador do projeto.

**Cronograma:** Atende às exigências. Consta no corpo do projeto e em anexo.

**Revisão e referências:** Atualizadas, sustentam os objetivos do estudo.

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:** O TCLE está em linguagem adequada, clara para compreensão dos participantes do estudo, com descrição suficiente dos

procedimentos, explicitação de riscos e forma de contato com o pesquisador e demais membros da equipe.

**Pesquisador:** titulação e apresenta experiência e qualificação para a coordenação do estudo. Demais membros da equipe também apresentam qualificação para atividade que desempenharão durante o estudo.

**O CEP solicita ao pesquisador que atenda a Carta Circular nº 003/2011 CONEP/CNS datada de 21 de março de 2011, que torna obrigatória a rubrica em todas as páginas do TCLE pelo sujeito de pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador em todos os TCLEs com data posterior a 01 de abril de 2011.**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-HU/CAS da UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96 e suas complementares manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Salientamos que o pesquisador deverá encaminhar a este comitê o relatório final.

**Situação:** Projeto Aprovado

Juiz de Fora, 28 de novembro de 2011.

  
Prof.ª Dra. Angela Maria Gollner  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
HU/CAS da UFJF

<b>RECEBI</b>
DATA: ___/___/2011
ASS: _____

# ANEXO B

## NORMAS PARA PUBLICAÇÃO: INTERNATIONAL JOURNAL OF PAEDIATRIC DENTISTRY

### Guidelines for Original Articles

**Content of Author Guidelines:** 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Manuscript Submission Procedure, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance.

**Relevant Documents:** Sample Manuscript

**Useful Websites:** Submission Site, Articles published in *International Journal of Paediatric Dentistry*, Author Services, Wiley-Blackwell's Ethical Guidelines, Guidelines for Figures.

#### CrossCheck

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

#### 1. GENERAL

*International Journal of Paediatric Dentistry* publishes papers on all aspects of paediatric dentistry including: growth and development, behaviour management, prevention, restorative treatment and issue relating to medically compromised children or those with disabilities. This peer-reviewed journal features scientific articles, reviews, clinical techniques, brief clinical reports, short communications and abstracts of current paediatric dental research. Analytical studies with a scientific novelty value are preferred to descriptive studies. Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after acceptance of a manuscript for publication in *International Journal of Paediatric Dentistry*. Authors are encouraged to visit Wiley-Blackwell Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

In June 2007 the Editors gave a presentation on How to write a successful paper for the *International Journal of Paediatric Dentistry*.

#### 2. ETHICAL GUIDELINES

Submission is considered on the conditions that papers are previously unpublished, and are not offered simultaneously elsewhere; that authors have read and approved the content, and all authors have also declared all competing interests; and that the work complies with the Ethical Policies of the Journal and has been conducted under internationally accepted ethical standards after relevant ethical review.

#### 3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Articles for the *International Journal of Paediatric Dentistry* should be submitted electronically via an online submission site. Full instructions and support are available on the site and a user ID and password can be obtained on the first visit. Support is available by phone (+1 434 817 2040 ext. 167) or here. If you cannot submit online, please contact Jenifer Jimenez in the Editorial Office by e-mail IJPDedoffice@wiley.com.

##### 3.1. Getting Started

Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/ijpd>

\*Log-in or, if you are a new user, click on 'register here'.

\*If you are registering as a new user.

- After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.

- Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'

- Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.

\*If you are already registered, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under 'Password Help'. The

system will send you an automatic user ID and a new temporary password.

\*Log-in and select 'Author Center'.

### 3.2. Submitting Your Manuscript

After you have logged into your 'Author Center', submit your manuscript by clicking on the submission link under 'Author Resources'.

\* Enter data and answer questions as appropriate.

\* You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter. **Please note** that a separate *Title Page* must be submitted as part of the submission process as 'Title Page' and should contain the following:

- Word count (excluding tables)
- Authors' names, professional and academic qualifications, positions and places of work. They must all have actively contributed to the overall design and execution of the study/paper and should be listed in order of importance of their contribution
- Corresponding author address, and telephone and fax numbers and email address

\*Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.

\*You are required to upload your files.

- Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.

- Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.

- When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.

\* Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

### 3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and a PDF document on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below. Please note that any manuscripts uploaded as Word 2007 (.docx) is now accepted by IPD. As such manuscripts can be submitted in both .doc and .docx file types.

### 3.4. Review Process

The review process is entirely electronic-based and therefore facilitates faster reviewing of manuscripts. Manuscripts will be reviewed by experts in the field (generally two reviewers), and the Editor-in-Chief makes a final decision. *The International Journal of Paediatric Dentistry* aims to forward reviewers' comments and to inform the corresponding author of the result of the review process. Manuscripts will be considered for 'fast-track publication' under special circumstances after consultation with the Editor-in-Chief.

### 3.5. Suggest a Reviewer

*International Journal of Paediatric Dentistry* attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of a potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript and their area of expertise. In addition to your choice the journal editor will choose one or two reviewers as well.

### 3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

### 3.7. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

### 3.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts any time to check your 'Author Center' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

### 3.9. Submission of Revised Manuscripts

Revised manuscripts must be uploaded within 2 months of authors being notified of conditional acceptance pending satisfactory revision. Locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision' to submit your revised manuscript. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript. All revisions must be accompanied by a cover letter to the editor. The letter must a) detail on a point-by-point basis the author's response to each of the referee's comments, and b) a revised manuscript highlighting exactly what has been changed in the manuscript after revision.

### 3.10 Online Open

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

For the full list of terms and conditions, see

[http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen\\_Terms](http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms).

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at [https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen\\_order.asp](https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp)

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

## 4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

**Original Articles:** Divided into: Summary, Introduction, Material and methods, Results, Discussion, Bullet points, Acknowledgements, References, Figure legends, Tables and Figures arranged in this order. The summary should be structured using the following subheadings: Background, Hypothesis or Aim, Design, Results, and Conclusions and should be less than 200 words. A brief description, in bullet form, should be included at the end of the paper and should describe Why this paper is important to paediatric dentists.

**Review Articles:** may be invited by the Editor.

**Short Communications:** should contain important, new, definitive information of sufficient significance to warrant publication. They should not be divided into different parts and summaries are not required.

**Clinical Techniques:** This type of publication is best suited to describe significant improvements in clinical practice such as introduction of new technology or practical approaches to recognised clinical challenges.

**Brief Clinical Reports/Case Reports:** Short papers not exceeding 800 words, including a maximum of three illustrations and five references may be accepted for publication if they serve to promote communication between clinicians and researchers. If the paper describes a genetic disorder, the OMIM unique six-digit number should be provided for online cross reference (Online Mendelian Inheritance in Man).

A paper submitted as a Brief Clinical/Case Report should include the following:

- a short **Introduction** (avoid lengthy reviews of literature);
- the **Case report** itself (a brief description of the patient/s, presenting condition, any special investigations and outcomes);
- a **Discussion** which should highlight specific aspects of the case(s), explain/interpret the main findings and provide a scientific appraisal of any previously reported work in the field.
- Please provide up to 3 bullet points for your manuscript under the heading: 1. Why this clinical report is important to paediatric dentists. Bullet points should be added to the end of your manuscript, before the references.

**Letters to the Editor:** Should be sent directly to the editor for consideration in the journal.

## 5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

### 5.1.Format

**Language:** The language of publication is English. UK and US spelling are both acceptable but the spelling must be consistent within the manuscript. The journal's preferred choice is UK spelling. Authors for whom English is a second language must have

their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at [http://authorservices.wiley.com/bauthor/english\\_language.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication

## 5.2. Structure

The whole manuscript should be double-spaced, paginated, and submitted in correct English. The beginning of each paragraph should be properly marked with an indent.

**Original Articles (Research Articles):** should normally be divided into: Summary, Introduction, Material and methods, Results, Discussion, Bullet points, Acknowledgements, References, Figure legends, Tables and Figures arranged in this order. **Summary** should be structured using the following subheadings: Background, Hypothesis or Aim, Design, Results, and Conclusions.

**Introduction** should be brief and end with a statement of the aim of the study or hypotheses tested. Describe and cite only the most relevant earlier studies. Avoid presentation of an extensive review of the field.

**Material and methods** should be clearly described and provide enough detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary repeated. Use section subheadings in a logical order to title each category or method. Use this order also in the results section. Authors should have considered the ethical aspects of their research and should ensure that the project was approved by an appropriate ethical committee, which should be stated. Type of statistical analysis must be described clearly and carefully.

**(i) Experimental Subjects:** Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

**(ii) Clinical trials** should be reported using the CONSORT guidelines available at [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org). A CONSORT checklist should also be included in the submission material. *International Journal of Paediatric Dentistry* encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

**(iii) DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations:** Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly. **Results** should clearly and concisely report the findings, and division using subheadings is encouraged. Double documentation of data in text, tables or figures is not acceptable. Tables and figures should not include data that can be given in the text in one or two sentences.

**Discussion** section presents the interpretation of the findings. This is the only proper section for subjective comments and reference to previous literature. Avoid repetition of results, do not use subheadings or reference to tables in the results section.

**Bullet Points** should include one heading:

\*Why this paper is important to paediatric dentists.

Please provide maximum 3 bullets per heading.

**Review Articles:** may be invited by the Editor. Review articles for the *International Journal of Paediatric Dentistry* should include: a) description of search strategy of relevant literature (search terms and databases), b) inclusion criteria (language, type of studies i.e. randomized controlled trial or other, duration of studies and chosen endpoints, c) evaluation of papers and level of evidence. For examples see: Twetman S, Axelsson S, Dahlgren H et al. Caries-preventive effect of fluoride toothpaste: a systematic review. *Acta Odontologica Scandinavica* 2003; 61: 347-355. Paulsson L, Bondemark L, Söderfeldt B. A systematic review of the consequences of premature birth on palatal morphology, dental occlusion, tooth-crown dimensions, and tooth maturity and eruption. *Angle Orthodontist* 2004; 74: 269-279.

**Clinical Techniques:** This type of publication is best suited to describe significant improvements in clinical practice such as introduction of new technology or practical approaches to recognised clinical challenges. They should conform to highest scientific and clinical practice standards.

**Short Communications:** Brief scientific articles or short case reports may be submitted, which should be no longer than three pages of double spaced text, and include a maximum of three illustrations. They should contain important, new, definitive information of sufficient significance to warrant publication. They should not be divided into different parts and summaries are not required.

**Acknowledgements:** Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Please also include specifications of the source of funding for the study and any potential conflict of interests if appropriate. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

### 5.3. References

A maximum of 30 references should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text (Vancouver System). They should be identified in the text by superscripted Arabic numbers and listed at the end of the paper in numerical order. Identify references in text, tables and legends. Check and ensure that all listed references are cited in the text. Non-refereed material and, if possible, non-English publications should be avoided. Congress abstracts, unaccepted papers, unpublished observations, and personal communications may not be placed in the reference list. References to unpublished findings and to personal communication (provided that explicit consent has been given by the sources) may be inserted in parenthesis in the text. Journal and book references should be set out as in the following examples:

1. Kronfol NM. Perspectives on the health care system of the United Arab Emirates. *East Mediter Health J.* 1999; 5: 149-167.
2. Ministry of Health, Department of Planning. Annual Statistical Report. Abu Dhabi: Ministry of Health, 2001.
3. Al-Mughery AS, Attwood D, Blinkhorn A. Dental health of 5-year-old children in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991; 19: 308-309.
4. Al-Hosani E, Rugg-Gunn A. Combination of low parental educational attainment and high parental income related to high caries experience in preschool children in Abu Dhabi. *Community Dent Oral Epidemiol* 1998; 26: 31-36.

If more than 6 authors please, cite the three first and then et al. When citing a web site, list the authors and title if known, then the URL and the date it was accessed (in parenthesis). Include among the references papers accepted but not yet published; designate the journal and add (in press). Please ensure that all journal titles are given in abbreviated form. We recommend the use of a tool such as [Reference Manager](#) for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: [www.refman.com/support/rmstyles.asp](http://www.refman.com/support/rmstyles.asp).

### 5.4. Illustrations and Tables

**Tables:** should be numbered consecutively with Arabic numerals and should have an explanatory title. Each table should be typed on a separate page with regard to the proportion of the printed column/page and contain only horizontal lines

**Figures and illustrations:** All figures should be submitted electronically with the manuscript via ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central). Each figure should have a legend and all legends should be typed together on a separate sheet and numbered accordingly with Arabic numerals. Avoid 3-D bar charts.

**Preparation of Electronic Figures for Publication:** Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible).

For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Wiley-Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>.

## 6. AFTER ACCEPTANCE

### 6.1. Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

**For authors signing the copyright transfer agreement**

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:  
CTA Terms and Conditions <http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-301.html>

**For authors choosing OnlineOpen**

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services <http://exchanges.wiley.com/authors/faqs--copyright-301.html> and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF)] you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with your Funder requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

**6.2. Permissions**

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the publisher.

**6.3. NIH Public Access Mandate**

For those interested in the Wiley-Blackwell policy on the NIH Public Access Mandate, [please visit our policy statement](#)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
CENTRO INTEGRADO DE SAÚDE  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PPG-MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

**Camila Faria Carrada**

**BACTÉRIAS PERIODONTOPATOGÊNICAS  
DETECTADAS, IDENTIFICADAS E QUANTIFICADAS  
NA SALIVA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES  
COM SÍNDROME DE DOWN**

Juiz de Fora

2015

CARRADA, C. F. Bactérias periodontopatogênicas detectadas, identificadas e quantificadas na saliva de crianças e adolescentes com síndrome de Down. Juiz de Fora (MG). 2015. 83f. Apresentação da Dissertação (Curso de Pós-Graduação *stricto sensu* – Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora (MG).