

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

MAURÍCIO JOSÉ SANTOS MOREIRA

CÁRIE DENTÁRIA EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE DOWN

Porto Alegre

2016

MAURÍCIO JOSÉ SANTOS MOREIRA

Linha de pesquisa

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

CÁRIE DENTÁRIA EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE DOWN

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lina Naomi Hashizume

Porto Alegre

2016

## CIP - Catalogação na Publicação

MOREIRA, MAURÍCIO JOSÉ SANTOS

CÁRIE DENTÁRIA EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE DOWN

/ MAURÍCIO JOSÉ SANTOS MOREIRA. -- 2016.

72 f.

Orientador: LINA NAOMI HASHIZUME.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,

2016.

1. CÁRIE DENTÁRIA. 2. SÍNDROME DE DOWN. I. HASHIZUME, LINA NAOMI, orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

À professora Lina Naomi Hashizume, minha orientadora de TCC de graduação, dissertação de mestrado e tese de doutorado. Minha mentora na arte da pesquisa científica e que só tenho a agradecer por todos os ensinamentos, carinho e respeito de todos esses anos de trabalho.

À professora Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo, minha co-orientadora de tese de doutorado, por seus ensinamentos sempre com muita atenção e gentileza.

Às alunas de graduação em Odontologia da UFRGS, Ana Paula Dall'Onder, Débora Grando e Natália Mincato Klaus, minhas amigas e futuras colegas de profissão, pela ajuda, amizade e companheirismo destes últimos anos e sem às quais este trabalho seria muito mais difícil de ser executado. À minha querida amiga Carolina Schwertner, mestranda em Cariologia-Dentística, por toda ajuda e companheirismo em muitos anos de trabalho juntos.

À Luísa Weber Mercado, técnica do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal (Labim) da UFRGS, companheira de trabalho laboratorial durante toda a minha jornada acadêmica, sempre com muitos ensinamentos, alegria e risadas.

Aos professores e alunos do Labim por toda a ajuda, companheirismo e cafés em muitos anos de convivência.

À comunidade da Faculdade de Odontologia da UFRGS que foi a minha segunda casa durante todos esses anos de aprendizado constante em termos científico, profissional e pessoal.

Aos pais e às crianças com e sem síndrome de Down que participaram deste estudo por toda gentileza e receptividade com a equipe deste trabalho.

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

À minha noiva, Francine Paranhos, todo meu agradecimento e meu amor pela paciência enquanto eu escrevia este trabalho, por toda a sua ajuda e companheirismo em todos os momentos.

## RESUMO

A síndrome de Down (SD) é a anomalia genética mais comum em seres humanos e acomete todas as etnias e níveis socioeconômicos. Esta síndrome também se manifesta na cavidade bucal dos indivíduos, alterando tecidos moles e duros, a constituição salivar e a microbiologia oral. Em relação à cárie dentária, muitos estudos na literatura avaliaram a experiência desta doença nas pessoas com SD, mas os resultados são conflitantes. Enquanto a maioria dos trabalhos reportou uma menor experiência de cárie nas pessoas com a síndrome comparadas a indivíduos não sindrômicos, outros estudos não mostraram diferença. Assim, três estudos foram conduzidos para elucidar algumas controvérsias. O primeiro estudo foi uma revisão sistemática de literatura que teve como objetivo determinar se existem ou não diferenças na experiência de cárie entre pessoas com e sem SD. Foram incluídos 13 artigos para extração dos dados. Entretanto, devido à baixa qualidade metodológica de todos os estudos, concluiu-se que não existe evidência científica para suportar a hipótese que pessoas com SD apresentem menor experiência de cárie do que indivíduos não sindrômicos. O segundo estudo teve caráter observacional e transversal e foi conduzido com 131 crianças entre 6 e 12 anos de idade (60 com SD e 71 sem SD). Foram verificados os índices de placa (IP), índice de sangramento gengival (ISG), experiência de cárie e quantificação salivar *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). Questionários que incluíam hábitos de escovação, dieta e renda dos participantes foram realizados. A experiência de cárie foi similar entre os dois grupos. Os IP e ISG foram menores nas crianças com SD e isto foi associado a uma maior supervisão dos pais ou responsáveis durante a escovação. Significativamente mais crianças com SD tiveram altas contagens salivares de *S. mutans*. O estudo concluiu que crianças com e sem SD da mesma faixa-etária apresentam experiência de cárie similar. Entretanto, crianças com SD frequentemente apresentam maiores contagens salivares de *S. mutans* do que crianças sem a síndrome. Além disso, crianças com SD que têm escovação supervisionada por pais ou cuidadores apresentam menores índices de placa e sangramento gengival. O terceiro estudo foi observacional laboratorial conduzido com o objetivo de avaliar a diversidade genotípica de *S. mutans* e a acidogenicidade de diferentes genótipos deste microrganismo em crianças com e sem SD. Dezesete crianças (9 com SD e 8 sem SD) com altas contagens salivares de *S. mutans* foram

selecionadas. Elas foram divididas em dois grupos: livres de cárie e com alta experiência de cárie. Isolados de *S. mutans* foram obtidos de cada paciente e 99 cepas (50 de SD e 49 sem SD) foram confirmadas utilizando PCR. Por meio de AP-PCR, observaram-se os diferentes perfis genotípicos. A acidogenicidade de uma cepa representativa para cada genótipo obtido foi avaliada. As crianças com SD tiveram uma menor diversidade genotípica de *S. mutans* do que as crianças sem a síndrome, e os genótipos avaliados das crianças com SD foram significativamente menos acidogênicos do que nas crianças sem síndrome. O estudo concluiu que crianças com SD apresentam genótipos de *S. mutans* menos acidogênicos quando comparados aos de crianças sem a síndrome. Os resultados dos trabalhos realizados permitem concluir que: não existem evidências científicas que suportem a hipótese que pessoas com SD apresentem menor experiência de cárie do que indivíduos sem a síndrome; pessoas com SD apresentam experiência de cárie similar a pessoas sem a síndrome; existe uma maior frequência de crianças com SD que apresentam altas contagens salivares de *S. mutans* do que crianças sem a síndrome; crianças com SD que têm escovação supervisionada por pais ou cuidadores apresentam menores índices de placa e sangramento gengival; os genótipos de *S. mutans* encontrados na cavidade bucal de crianças com SD são menos acidogênicos do que os das crianças sem síndrome.

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

## ABSTRACT

Down Syndrome (DS) is the most common genetic anomaly in human, affecting all ethnicities and socioeconomic levels. The syndrome has also manifestations in the oral cavity of the subjects, altering soft and hard tissues, salivary constitution and oral microbiology. Regarding dental caries, previous studies have found conflicting results when evaluating the caries experience in DS subjects. While the majority of researchers reported a lower caries experience in DS versus non-DS subjects, other studies did not find difference. In order to elucidate the controversies, three studies were conducted. The first study was a systematic review with the aim of determining if there was difference in the caries experience in DS and non-DS subjects. In total, 13 articles were included for data extraction. However, due to the low methodological quality of all the studies, it was concluded that there was no scientific evidence to support the hypothesis that DS subjects have a lower caries experience than non-DS subjects. The second study was observational and cross-sectional and was performed with 131 children aged between 6-12 (60 with DS and 71 non-DS). The plaque index (PI), gingival bleeding index (GBI), caries experience and salivary *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) quantification were investigated. Questionnaires that included tooth brushing habits, diet and income of the subjects were performed. Caries experience was similar in both groups. PI and GBI were lower in DS subjects, what was associated with a higher parental/caregiver supervision. Significantly more children with DS had high salivary counts of *S. mutans*. The study concluded that children with and without DS of the same age range have similar caries experience. However, children with DS often have higher salivary counts of *S. mutans* than children without the syndrome. In addition, children with DS who have tooth brushing supervised by parents or caregivers have lower PI and GBI. The third study was laboratory observational aimed to evaluate the *S. mutans* genotypical diversity and the associated acidogenicity in DS and non-DS children. Seventeen children (9 DS and 8 non-DS) with high salivary counts of *S. mutans* were selected and divided in two groups: caries-free and high caries experience. *S. mutans* isolates were obtained from each subject and 99 strains (50 in DS and 49 in non-DS) were confirmed through PCR. Different genotypical profiles were observed through AP-PCR technique. The acidogenicity of a representative strain from each genotype was

analysed. DS children presented a lower *S. mutans* genotypical diversity than non-DS children. Moreover, the DS genotypes were significantly associated with less acidogenic than non-DS. The study concluded that children with DS present less acidogenic *S. mutans* genotypes when compared to children without the syndrome. In summary, the results of this studies allow conclude that: DS subjects have a similar caries experience than non-DS subjects; a significant higher frequency of DS children have higher *S. mutans* salivary counts than children without the syndrome; children with DS who have tooth brushing supervised by parents or caregivers have lower PI and GBI; the genotypes of *S. mutans* found in the oral cavity of children with DS are less acidogneic than those of children without the syndrome.

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



## SUMÁRIO

|      |  |    |
|------|--|----|
| 1    | INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....  | 9  |
| 1.1  | Histórico.....   | 9  |
| 1.2  | Etiopatogenia e tipos de síndrome de Down.....   | 9  |
| 1.3  | Incidência, prevalência, causas e sobrevida.....   | 10 |
| 1.4  | Diagnóstico.....   | 11 |
| 1.5  | Características.....   | 12 |
| 1.6  | Anomalias sistêmicas.....  | 13 |
| 1.7  | Anomalias orais.....   | 14 |
| 1.8  | Anomalias dentárias.....   | 15 |
| 1.9  | Cárie dentária em indivíduos com síndrome de Down.....   | 16 |
| 1.10 | Cárie dentária e <i>Streptococcus mutans</i> .....   | 20 |
| 1.11 | Diversidade genotípica e virulência de <i>Streptococcus mutans</i> .....   | 22 |
| 1.12 | Objetivos.....   | 26 |
| 2    | ARTIGO CIENTÍFICO: DENTAL CARIES IN INDIVIDUALS WITH DOWN SYNDROME: A SYSTEMATIC REVIEW .....  | 27 |
| 3    | ARTIGO CIENTÍFICO: ORAL HEALTH STATUS AND SALIVARY LEVELS OF MUTANS STREPTOCOCCI IN CHILDREN WITH DOWN SYNDROME .....                                  | 28 |
| 4    | ARTIGO CIENTÍFICO: ACIDOGENICITY AND GENOTYPIC DIVERSITY OF <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i> IN DOWN SYNDROME CHILDREN RELATED TO DENTAL CARIES STATUS..... | 29 |
| 5    | CONSIDERAÇÕES FINAIS.....  | 63 |
|      | REFERÊNCIAS.....   | 64 |
|      | ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....  | 69 |
|      | ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE.....   | 70 |

# 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 Histórico

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

A causa da SD permaneceu desconhecida até a metade do século XX. Os avanços da Ciência e da Medicina, as descobertas de cariotipagem e a definição do exato número de cromossomos presentes no genoma humano permitiram que Lejeune e cols. (4) e Jacobs e cols. (5) - de forma independente - mostrassem, em 1959, que a SD é causada por um terceiro cromossomo presente no 21º par. Em vez dos usuais 46 cromossomos, indivíduos com SD têm, na maioria das vezes, 47 cromossomos em cada uma de suas células.

## 1.2 Etiopatogenia e tipos de síndrome de Down

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

Duas hipóteses foram propostas para explicar a relação da cópia extra do cromossomo 21 com as características associadas à SD. A primeira hipótese, chamada de “instabilidade do desenvolvimento”, fala sobre a perda do balanço genético, entre as centenas de genes, no cromossomo 21 levando a um desequilíbrio na expressão gênica (6); a segunda hipótese, chamada de “efeito gene-dosagem”, afirma que o excesso de genes no cromossomo 21 resulta em um fenótipo anormal (7). Também foi proposto que esses mecanismos poderiam atuar em conjunto.

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

Usualmente, a SD é causada por um erro na divisão celular chamada de não-disjunção. Esta é a condição mais comum entre indivíduos com SD, acometendo 95% dos casos (8). Nesta situação, previamente ou no ato da concepção, um cromossomo do 21º par falha em se separar ou no espermatozoide ou no óvulo, deixando um dos gametas com 24 cromossomos. Como o embrião se desenvolve, o cromossomo extra é replicado em todas as células do corpo.

Na translocação, parte do cromossomo 21 se quebra durante a divisão celular e se junta a outro cromossomo, normalmente o 14º par. Nesta situação, os indivíduos permanecem com 46 pares de cromossomos, mas a presença de uma parte extra do 21º par em outro local leva às características da SD. A translocação acontece em 4% dos casos (8).

Os casos de mosaïcismo ocorrem quando a não-disjunção do cromossomo 21 acontece em uma - e não em todas - das divisões celulares iniciais após a fertilização. Quando isso ocorre, há uma mistura de dois tipos de células: algumas contendo os usuais 46 cromossomos, e outras com 47. Aquelas células com 47 cromossomos contêm um cromossomo extra no 21º par. Os casos de mosaïcismo acometem em torno de 1% dos casos da SD (8).

### 1.3 Incidência, prevalência, causas e sobrevida

A SD é a alteração genética mais comum em seres humanos, acometendo todas as etnias e níveis socioeconômicos. A incidência média de crianças com SD é de uma a cada 1000 nascimentos (9). No Brasil, estima-se que nasça uma criança com SD a cada 700 nascimentos (10). O censo não registra o número de pessoas com SD, mas estima-se que aproximadamente 300 mil brasileiros têm esta alteração genética (11).

A causa para a não-disjunção cromossômica ainda é desconhecida, mas estudos mostram que há um aumento da frequência desta alteração com o aumento da idade materna (8). Uma mulher aos 35 anos de idade tem, aproximadamente, uma chance em 350 de ter um filho com a síndrome. Esta chance aumenta gradualmente para uma em 100 aos 40 anos, e aumenta consideravelmente para uma chance em 30 aos 45 anos de idade. Entretanto, devido à maior frequência de

nascimentos em mulheres mais novas, cerca de 80% das crianças com SD são filhos de mulheres com menos de 35 anos de idade (8).

Nenhuma pesquisa científica, até o momento, indicou que a SD seja causada por fatores ambientais ou hábitos dos pais antes ou durante a gravidez. A cópia do cromossomo 21 (parcial ou total) que causa a SD pode ser originária do pai ou da mãe. Entretanto, apenas 5% dos casos são provenientes do pai (8).

Os três tipos da SD - trissomia do 21, mosaicismos e translocação - são condições genéticas, mas apenas 1% dos casos da síndrome tem componentes hereditários. A hereditariedade não é um fator de risco para trissomia do 21 e do mosaicismos. Entretanto, um terço dos casos de SD resultante de translocação tem componente hereditário envolvido (8).

Entre 1942 e 1952, a porcentagem de sobrevivência de uma criança com SD com menos de 12 meses de idade era menos de 50% no Reino Unido (12). Entretanto, entre 1999 e 2003 a porcentagem de morte em crianças com menos de um ano de idade com SD passou a ser de 4,4% (13). Devido a diversos fatores, tais como os avanços da medicina preventiva e terapêutica, melhora na dieta e hábitos saudáveis faz com que a expectativa de vida de uma pessoa com SD chegue hoje aos 60 anos de idade (13).

As causas mais comuns de mortalidade em pessoas com SD são as doenças respiratórias (principalmente a pneumonia), doenças cardíacas congênitas, distúrbios circulatórios e demência (13). As crianças com SD têm um risco aumentado de leucemia e câncer testicular (14). Os melhores preditores de sobrevivência em crianças com SD são idade gestacional no parto, peso ao nascer, cariótipo (trissomia 21/ mosaicismos /translocação) e a presença de anomalias anatômicas (15).

#### 1.4 Diagnóstico

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

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

A translucência nuchal – medição da prega nuchal do feto – serve como uma triagem para que, caso haja suspeita da SD, seja feita uma confirmação laboratorial

do diagnóstico. A translucência nucal é realizada por meio de uma ecografia entre a 12ª e 13ª semana de gestação. A prega de uma nuca normal mede de 2,3 a 2,6 milímetros. Se esta medida estiver maior, pode ser indício da SD. A coleta de vilosidades coriônicas consiste na retirada de material genético da placenta (que tem material genético idêntico ao feto) para posterior exame laboratorial de cariótipo. Este exame deve ser realizado entre a 12ª e 15ª semana de gestação. A amniocentese consiste na retirada de líquido amniótico para análise. Este exame é realizado após a 15ª semana de gestação. Existe uma chance de 99% de acerto, e 1% de falha por risco de aborto resultante do procedimento (8). Tanto a biópsia de vilosidades coriônicas quanto a amniocentese são exames mais invasivos do que a translucência nucal e são realizados apenas para confirmar uma suspeita deste último exame.

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

### 1.5 Características

Pessoas com SD podem apresentar desordens musculoesqueléticas, tais como: ponte nasal achatada; língua larga e protusa; cabeça, boca, orelha e nariz pequenos; excesso de pele na parte posterior do pescoço; pés, mãos e dedos pequenos; hipotonia; ligamentos frouxos; espaço grande entre o primeiro e segundo dedo do pé; displasia do quadril; pés planos; instabilidade patelar; baixa massa óssea. Também podem apresentar problemas cognitivos e neurológicos, tais como: deficiência intelectual de leve à severa; doença de Alzheimer; convulsões; problemas cardíacos, tais como defeito no septo atrioventricular; defeito no septo ventricular; tetralogia de Fallot; problemas de visão e audição, tais como esotropia

(olhos cruzados); catarata; miopia, fissuras palpebrais oblíquas; manchas de Brushfield em volta da íris; dificuldade na audição; e problemas metabólicos, tais como: atresia duodenal; disfunção da tireoide; além de serem comuns infecções e depressão (8, 16, 17).

Os indivíduos com SD podem apresentar dificuldade na linguagem verbal, escrita, leitura e aritmética (18). Estudos sobre os problemas de comportamento indicam que, em média, de um quarto a um terço das crianças com SD têm significantes problemas de comportamento e emocionais (19, 20). Também podem ocorrer problemas de concentração e déficit de atenção, retraimento social, teimosia e desobediência (19).

### 1.6 Anomalias sistêmicas

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

As anomalias cardíacas congênitas estão presentes em cerca de 40 a 50% das pessoas com SD (21, 22). Entretanto, cirurgias durante a infância para a correção de defeitos cardíacos são, na maioria dos casos, bem sucedidas e levam a um bom prognóstico. Cuidado especial deve ser tomado em relação à profilaxia antimicrobiana, que deve ser seguida, quando indicada, segundo as diretrizes da *American Heart Association* (23).

Anomalias hematopoiéticas levam indivíduos com SD a terem maior suscetibilidade a infecções. Entretanto, sua exata patogênese ainda é desconhecida. Infecções na pele, mucosa, gastrointestinais e respiratórias são frequentes (22). Crianças com SD frequentemente apresentam problemas respiratórios devido à ineficiência de função mitocondrial no epitélio respiratório, regulação neuronal e células imunes transcritas do cromossomo 21 (24). Problemas respiratórios comuns incluem anomalias nas vias aéreas respiratórias, aspiração recorrente, apneia obstrutiva do sono e infecções recorrentes do trato respiratório (24). Aumento do estresse oxidativo e imunidade comprometida também podem aumentar a morbidade (25). Crianças com SD têm entre 10 e 15 vezes mais risco de desenvolver leucemia do que crianças sem a síndrome (26). Lesões persistentes e sangramento gengival espontâneo podem ser indícios de leucemia (27). Neste

sentido, a atenção do cirurgião-dentista a qualquer manifestação bucal é de suma importância.

Uma alteração músculo-esquelética comum em indivíduos com SD é o pouco desenvolvimento do terço médio da face, levando ao prognatismo (27). A passagem de ar pelo nariz é usualmente estreita e parcialmente obstruída, resultado de desvio de septo e espessamento da mucosa. Isso leva frequentemente à respiração bucal. A boca mantida aberta para respirar faz com que a língua seja empurrada para entre os lábios (27).

Pessoas com SD usualmente têm sua função motora deficiente, mas a coordenação aumenta com a idade (27). Assim, torna-se importante o cuidado de um responsável ao realizar a higiene bucal do indivíduo com SD até que ele tenha condições suficientes para realizá-la sozinho.

Aproximadamente 30% das pessoas com SD são afetadas pela demência (27). Após os 35 anos de idade, muitas desenvolvem mudanças neuropáticas análogas às encontradas na doença de Alzheimer (26). Indivíduos com SD exibem uma ampla variedade de deficiência intelectual, variando de quase normal até severa (26).

### 1.7 Anomalias orais

Alterações estomatognáticas são comuns em indivíduos com SD.

O terço médio da face pode ser hipoplásico em relação à mandíbula, o que resulta em diminuição do comprimento, altura e profundidade do palato, enquanto que a largura não é afetada (27). Uma significativa redução do comprimento do palato leva a uma aparência ogival.

A reduzida cavidade bucal leva a língua a tentar se posicionar entre os lábios. Como consequência, a boca dos indivíduos com SD tende a ficar aberta. Assim, a respiração bucal é um achado frequente, aumentando também o risco de infecções do trato respiratório (26). A saliva que se acumula na comissura bucal por esse processo provoca maior tendência de desenvolvimento de queilite angular (27).

A língua de pessoas com SD tem tendência de ser fissurada, dificultando a higienização e podendo causar halitose. A protusão da língua enquanto a pessoa bebe, come ou fala também é frequente. A pequena cavidade bucal dá a impressão de uma macroglossia, porém uma verdadeira macroglossia raramente acontece (27).

A má-oclusão é um achado frequente, principalmente mordida aberta anterior e mordida cruzada posterior (27). O bruxismo é um hábito parafuncional bastante encontrado, mesmo em crianças (28).

Pessoas com SD têm maior risco de desenvolver doença periodontal do que pessoas sem a síndrome (27, 36, 37). A doença periodontal começa em uma idade relativamente jovem, muitas vezes envolvendo a dentição decídua.

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

### 1.8 Anomalias dentárias

Pessoas com SD podem apresentar algumas anomalias dentárias importantes que devem ser conhecidas pelo cirurgião-dentista para que seja feito o correto acompanhamento destes pacientes. Estima-se que 95% dos pacientes com SD tenham pelo menos uma anomalia dentária (29).

A microdontia acontece em 35 a 55% das pessoas com SD, tanto na dentição decídua quanto na permanente (27). O reduzido tamanho dos dentes pode levar a diastemas, muito comum nesses indivíduos. Embora menores, a anatomia da coroa exibe pouca ou nenhuma diferença quando comparada a pessoas sem a síndrome, tanto em crianças quanto em adultos (30).

Estudos epidemiológicos têm apontado uma relação entre a presença de hipoplasia e opacidade demarcada como um risco aumentado de desenvolver cárie. Os defeitos de esmalte podem ser importantes indicadores de risco à cárie porque a ultra-estrutura do esmalte, que provavelmente é anormal, torna-se mais suscetível à desmineralização (31).

Anodontia parcial é muito comum entre pessoas com SD, sendo que 50% destes indivíduos são afetados (27). Os dentes mais afetados, em ordem decrescente são os terceiros molares, segundos pré-molares inferiores, incisivos laterais superiores e incisivos centrais inferiores (27).

Agenesia é bastante frequente em pessoas com SD, sendo 10 vezes mais prevalente do que na população em geral. Acontece com maior frequência em homens do que em mulheres, na mandíbula do que na maxila e do lado esquerdo do que no direito (30). Os dentes mais frequentemente afetados por agenesia são os



incisivos centrais inferiores, seguidos pelos incisivos laterais superiores, segundos pré-molares superiores e segundos pré-molares inferiores (30).

A erupção dentária pode ser atrasada nas pessoas com SD, tanto nos dentes decíduos quanto nos permanentes. Nos decíduos, por exemplo, a erupção dos primeiros dentes (incisivos centrais inferiores) pode ocorrer na idade de 12 a 14 meses, mas pode acontecer apenas aos 24 meses de idade da criança (32). Já nos dentes permanentes, a erupção dos incisivos centrais inferiores e primeiros molares pode acontecer quando a criança estiver com 8 a 9 anos (33). Também é frequente a erupção de dentes permanentes sem a esfoliação do decíduo, principalmente nas regiões anterior superior e inferior (27). A sequência de erupção dentária não varia de forma significativa entre pessoas com e sem SD, tanto em decíduos quanto em permanentes (32, 33).

Outras anomalias dentárias encontradas em pessoas com SD são o taurodontismo, dentes cônicos, dilacerações radiculares e dentes impactados (29).

### 1.9 Cárie dentária em indivíduos com a síndrome de Down

A cárie é uma doença açúcar-biofilme dependente modulada por outros fatores, tais como saliva, hábitos de escovação, acesso ao flúor, dentre outros. Para que uma lesão de cárie ocorra é indispensável a presença de um biofilme cariogênico e o consumo de carboidratos fermentáveis (34). É uma das doenças crônicas mais comuns nos seres humanos e uma das principais causas de perda dentária e dor (35).

Muitos estudos relatam que pessoas com SD têm menor experiência de cárie quando comparadas a indivíduos sem a síndrome (36,37,39-43),. Entretanto, muitos destes estudos apresentam pequeno número amostral, ausência de um grupo controle adequado, grande amplitude na faixa etária dos participantes ou mesmo ausência de análises estatísticas.

Barnett e cols. (36) examinaram 30 pacientes com SD com média de idade de 27,4 anos e verificaram menor prevalência de cárie em dentes permanentes nestes indivíduos, comparados com adultos de mesma faixa etária sem a síndrome. Os autores dividiram lesões em superfície oclusal e proximais e atribuíram a menor prevalência de cárie em adultos com SD ao menor índice de cárie em superfícies proximais. Sete indivíduos no grupo com SD foram considerados livres de cárie, e

apenas um no grupo controle. Além do baixo número amostral, este estudo não faz nenhuma análise estatística ao considerar a diferença entre os grupos.

Stabholz e cols. (37) encontram menor prevalência de cárie em crianças com SD de 8 a 13 anos. A média do número de superfícies de dentes permanentes cariadas, perdidas e obturadas (CPO-S) para as 32 crianças com SD examinadas foi de 1,2 ( $\pm 4,0$ ) significativamente menor do que os outros dois grupos de comparação (um grupo de crianças sem anomalias e outro com deficiência intelectual). Ao desmembrar o CPO-S das crianças com SD, este estudo mostra que o componente "C" (cariado) é o mais alto, evidenciando a falta de acesso ao serviço odontológico, ou mesmo a dificuldade de se realizar o tratamento nestes indivíduos. Além do baixo número amostral deste estudo, todas as crianças com SD eram institucionalizadas, diferentemente das crianças sem a síndrome que eram provenientes de uma escola da região. Vigild (38) mostra em seu estudo que pessoas com SD que vivem em instituição têm, significativamente, menor propensão a desenvolver lesões de cárie do que indivíduos com SD que vivem em suas casas, provavelmente devido às diferenças ambientais, tendo maior controle sobre a dieta e escovação desses indivíduos.

Morinushi e cols. (39) avaliaram 75 crianças com SD entre 2 e 18 anos de idade. Os autores mostram uma porcentagem de 46% de crianças livres de cárie. A polarização da cárie foi mostrada neste estudo, categorizando os indivíduos como tendo lesões leves ou graves. O trabalho destes autores, entretanto, não tem um grupo controle de comparação, e baseiam a prevalência de cárie em estudos epidemiológicos prévios.

Cogulu e cols. (40) encontraram menor prevalência de cárie em 75 crianças de 7 a 12 anos com SD comparadas a crianças da mesma faixa etária sem a síndrome. Os autores atribuem esta diferença a maior quantidade de IgA salivar encontrada nas crianças com SD. Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos no índice de placa, hábitos de escovação, frequência diária de exposição à sacarose, renda familiar, nível de educação dos pais, pH salivar, capacidade tampão e fluxo salivar.

Davidovich e cols. (41) avaliaram 70 crianças com SD com uma média de 4 anos de idade e encontraram nelas menor prevalência de cárie tanto em dentes decíduos quanto em permanentes quando comparadas a crianças sem a síndrome. Entretanto, o grupo controle deste trabalho foi composto por 32 crianças com média

de idade de 9 anos e que estavam sendo atendidas no Departamento de Pediatria da Universidade de Hadassah, Israel. Além do fato de a idade desempenhar um papel fundamental no aparecimento e progressão de lesões de cárie, espera-se que crianças que estejam sendo atendidas em um centro de saúde tenham mais doenças e, assim, a escolha deste grupo controle não foi adequada. Este estudo mostrou que a SD pode se manifestar sobre a composição das glândulas salivares, modificando o ambiente de eletrólitos na saliva.

Areais e cols. (42) encontraram menor prevalência de cárie em crianças e adolescentes (6 a 18 anos) com SD quando comparados a seus irmãos sem síndrome. Os autores atribuíram esta diferença ao menor número de *Streptococcus mutans* encontrado na saliva das crianças com SD. Este estudo ainda encontrou um menor fluxo salivar nas crianças com SD, o que poderia aumentar a suscetibilidade dessa população à carie, mostrando que outros fatores devem favorecer estas crianças com um efeito protetor contra a doença. Os autores não encontraram, ainda, diferença na quantidade de IgA e no pH salivar. Em um trabalho pregresso, Areias e cols. (28) justificam a menor prevalência de cárie da mesma amostra por meio de resultados obtidos em questionário, mostrando que os pais de pessoas com SD levam a criança especial mais precocemente ao dentista (antes dos 5 anos de idade) denotando maior atenção dos responsáveis à saúde bucal destas crianças quando comparadas a seus irmãos. O bruxismo e a erupção tardia dos dentes também foram achados significativos nas crianças com SD.

Macho e cols. (43) ao examinarem 138 pessoas com SD e 86 irmãos sem a síndrome entre 2 e 26 anos de idade, encontraram 72% de indivíduos livres de cárie no grupo com SD, enquanto apenas 46% dos irmãos não apresentaram a doença. Ao separar em grupos de idades, ainda foi encontrada uma diferença significativa ao comparar indivíduos de 6 a 12 anos e de 13 a 26 anos, sempre aqueles com SD apresentando menor índice de cárie.

Autores formulam hipóteses para explicar a menor prevalência de cárie encontrada em alguns estudos, mas os resultados entre os trabalhos são conflitantes. Desta forma, a exata patogênese da menor prevalência de cárie em pessoas com SD permanece desconhecida. Ainda, outros trabalhos não mostram diferença na prevalência de cárie de pessoas com e sem a SD (44-47).

Fung e cols. (44) examinaram 44 indivíduos com SD e 84 sem a síndrome entre 4 e 36 anos, e não encontraram diferença na prevalência de cárie entre os

grupos. Os autores mostraram que a maioria dos estudos não controla o fato de que pessoas com SD têm menor quantidade de dentes, seja por atraso na erupção, seja por hipodontia, e isto é que leva a menor prevalência de cárie encontrada. Neste estudo, quando se ajustou o número de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados (CPO-D) em relação ao número de dentes presentes, não foi encontrada diferença significativa na prevalência de cárie entre pessoas com e sem SD.

Ulseth e cols. (45) não encontraram diferença na prevalência de cárie entre 30 adultos com SD institucionalizados comparados com adultos da mesma instituição com deficiência intelectual.

Mathias e cols. (46) examinaram crianças entre 1 e 7 anos de idade, sendo 69 com SD e 69 sem a síndrome e também não encontraram diferença na prevalência de cárie entre os grupos.

Oredugba e cols. (47) não encontraram diferença na prevalência de cárie entre 43 pessoas com SD institucionalizadas e 43 sem a síndrome com uma média de 14 anos de idade. Este estudo ainda mostrou que a higiene bucal é similar entre crianças com e sem SD, mas acaba se deteriorando com a idade no grupo com SD.

Uma revisão sistemática de literatura com meta-análise avaliou a prevalência de cárie em pessoas com SD comparando com indivíduos sem a síndrome (48). Após definir os critérios de inclusão e exclusão de artigos científicos, os autores incluíram para leitura na íntegra 26 trabalhos. Destes, 13 foram incluídos para análise na revisão sistemática dos quais oito entraram na meta-análise. Dentre os 13 artigos selecionados, sete reportaram menor prevalência de cárie em pessoas com SD comparadas a indivíduos não sindrômicos, e quatro estudos não encontraram diferença na prevalência de cárie entre pessoas com e sem SD. Um estudo reportou maior prevalência de cárie em pessoas com SD do que no grupo controle, e outro estudo incluído reportou apenas o índice de dentes perdidos entre os grupos. A meta-análise incluiu apenas oito trabalhos devido à diferença na mensuração do índice de cárie entre os estudos. Os autores da revisão sistemática concluíram que indivíduos com SD têm menor prevalência de cárie do que pessoas sem a síndrome, embora as evidências científicas observadas no estudo tenham sido fracas, e sugeriram que mais estudos bem controlados para fatores de confusão deveriam ser elaborados. Contudo, essa revisão sistemática embora avalie a qualidade metodológica dos estudos incluídos por meio da escala Newcastle-Ottawa, os

autores não discutem as falhas no desenho experimental dos estudos incluídos que podem levar a erros de conclusão do assunto.

### 1.10 Cárie dentária e *Streptococcus mutans*

Dentre as bactérias cariogênicas, os *Streptococcus mutans* são geralmente relacionados ao início de lesões de cárie. Esta bactéria pode produzir grande quantidade de ácido a partir da metabolização de carboidratos fermentáveis e também sobreviver em um ambiente com baixo pH (49). Além disso, os *Streptococcus mutans* podem utilizar a sacarose da dieta do indivíduo para sintetizar polissacarídeos extracelulares (PEC) que são em sua maioria glucanos sintetizados por glicosiltransferases (GTF) (50). Os PECs, principalmente aqueles insolúveis em água, podem promover aderência seletiva de outros microrganismos e, assim, aumentar a espessura do biofilme, tornando-o mais poroso para difusão de ácidos, aumentando a sua cariogenicidade (51).

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

Alguns autores mostraram em seu estudo que 71% das fissuras de dentes cariados de crianças com menos de 10 anos de idade tinham contagens viáveis de *Streptococcus mutans* maior do que 10% do total cultivável da microbiota do biofilme, enquanto que 70% das fissuras que estavam livres de cárie não possuíam *Streptococcus mutans* detectáveis (52). Outros autores confirmaram que existe uma significativa correlação entre a prevalência de cárie e a quantidade de *Streptococcus mutans* presentes na saliva (53).

Posteriormente, outro estudo (54) acompanhou durante três anos 91 crianças entre 13 e 14 anos de idade avaliando a correlação dos níveis de infecção por *Streptococcus mutans* com incidência de cárie. Este trabalho observou que contagens salivares de *Streptococcus mutans* acima de  $250 \times 10^3$  UFC/mL foi significativamente correlacionada com uma maior incidência de cárie. Além disso, crianças com valores salivares de *Streptococcus mutans* acima de  $10^6$  UFC/mL foram associadas com maior atividade de cárie.

Outro estudo mostrou que, tanto nas fissuras quanto nas superfícies livres dos primeiros pré-molares permanentes de crianças de 7 e 8 anos de idade, apresentaram desmineralização sem cavitação quando fortemente colonizadas por *Streptococcus mutans* de 12 a 18 meses antes do diagnóstico clínico da lesão. Algumas lesões remineralizaram e os níveis de *Streptococcus mutans* caíram de forma significativa. O trabalho ainda mostrou que fissuras com níveis elevados de *Streptococcus mutans* podem não apresentar lesões, enquanto que outros sítios cariados não possuíam *Streptococcus mutans* em nenhum momento (55).

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

Areias e cols. (42) avaliaram fatores de risco ao desenvolvimento de lesões de cárie em 45 pessoas com SD em comparação com 45 irmãos desses indivíduos não afetados pela síndrome. O estudo encontrou, dentre outros achados, que o grupo com SD teve significativamente menor experiência de cárie e menores contagens salivares de *Streptococcus mutans* em comparação com o grupo sem síndrome. Os autores sugerem que a menor experiência de cárie nas pessoas com SD encontrada em muitos estudos pode ser devido à contagem deste microrganismo.

Shapira e cols.(56), embora tenham encontrado contagem numericamente menor de *Streptococcus mutans* na saliva não estimulada de crianças de 8 a 13 anos com SD, quando comparadas a crianças sem anomalias, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Contudo, crianças com deficiência intelectual apresentaram significativamente maior quantidade de *Streptococcus mutans* na saliva do que o grupo de crianças com SD e sem anomalias.

Mathias e cols. (46) verificaram as contagens de *Streptococcus mutans* na saliva não estimulada de 69 crianças de 1 a 7 anos com SD comparadas com o mesmo número de crianças da mesma faixa etária sem a síndrome. Ao categorizá-las como tendo baixas, médias ou altas contagens de *Streptococcus mutans*, verificaram que, significativamente mais crianças com SD tinham contagens classificadas como altas (acima de  $10^6$  UFC/mL). Por meio de regressão logística observaram que estas crianças apresentavam maior risco de desenvolvimento de lesões de cárie do que aquelas com contagens médias e baixas.

Castilho e cols. (57) avaliaram 60 pessoas com SD entre 1 e 48 anos de idade em relação à contagem salivar de *Streptococcus mutans*. Devido à dificuldade

de coleta de saliva nesses indivíduos, 18 deles tiveram a saliva estimulada coletada, e 40 tiveram a saliva não estimulada. Dois indivíduos não tiveram amostra de saliva. Daqueles 18 participantes com a saliva estimulada coletada, 17 tiveram contagens de *Streptococcus mutans* acima de  $10^6$  UFC/mL de saliva, e dos 40 indivíduos que tiveram a saliva não estimulada coletada, 18 tiveram contagem de *Streptococcus mutans* acima de  $10^6$  UFC/mL de saliva. Este estudo não tem um grupo de comparação de pessoas sem a síndrome, mas evidencia uma alta frequência de indivíduos síndrômicos com altas contagens salivares dessa bactéria.

Linossier e cols. (58) avaliaram 59 pessoas com SD e compararam com 60 pessoas sem a síndrome e 60 indivíduos com deficiência intelectual em relação à quantificação de serotipos de *Streptococcus mutans*. Os autores encontraram um serotipo específico apenas nos indivíduos com SD e com deficiência intelectual, enquanto que as pessoas sem síndrome não foram colonizadas por esse serotipo específico. Além disso, todos os grupos apresentaram *Streptococcus mutans* serotipos “c”, “e”, “f” e *Streptococcus sobrinus* serotipos “d”, “g”, “h”. Os autores sugerem com esses achados que existe diferença nas condições imunológicas e do ambiente oral entre esses indivíduos.

#### 1.11 Diversidade genotípica e virulência de *Streptococcus mutans*

A correlação entre atividade de cárie e diversidade genotípica de *Streptococcus mutans* ainda é controversa. Enquanto alguns estudos mostraram que pessoas com experiência de cárie apresentaram maior diversidade genotípica de *Streptococcus mutans* quando comparados a indivíduos livres de cárie, outros estudos mostram o contrário.

Alaluusua et al. (59) examinaram seis crianças entre 1,5 e 3 anos de idade que tinham alto índice de superfícies decíduas cariadas e restauradas (entre 17 e 63) e compararam com seis crianças da mesma faixa etária livres de cárie. Os autores observaram que entre as crianças com cárie, quatro delas foram colonizadas por mais do que um ribotipo de *Streptococcus mutans*, enquanto que as crianças livres de cárie tinham baixa proporção de *Streptococcus mutans* e apenas uma delas apresentou mais de um ribotipo. O estudo sugeriu que crianças com atividade de cárie e com alta frequência de consumo de açúcar têm maior

diversidade de *Streptococcus mutans* quando comparadas a crianças sem experiência de cárie.

Zhou et al. (60) avaliaram a diversidade genotípica de *Streptococcus mutans* em 87 crianças entre 3 e 4 anos de idade com alta experiência de cárie (cinco ou mais dentes decíduos cariados ou restaurados) e compararam com 91 crianças da mesma faixa etária livres de cárie. Os autores observaram que crianças com alta atividade de cárie na dentição decídua tinham significativamente uma maior diversidade genotípica de *Streptococcus mutans* na saliva do que crianças livres de cárie.

Entretanto, Kreulen et al. (61) mostraram uma correlação negativa entre atividade de cárie e diversidade genotípica de *Streptococcus mutans* ao avaliarem sete pares de irmãos, sendo que um tinha cárie precoce de infância e o outro irmão não. A média de idade das crianças com atividade de cárie foi 3,7 anos, e o grupo controle tinha média de idade de 5,7 anos. Neste estudo, as crianças com atividade de cárie tiveram apenas um tipo clonal de *Streptococcus mutans*, enquanto que o grupo controle sem atividade de cárie teve de 2 a 5 tipos clonais.

Pesquisas recentes têm utilizado métodos moleculares para diferenciação entre genótipos dentro da mesma espécie de microrganismo. Alguns autores (62-64) verificaram que a técnica que utiliza oligonucleotídeos iniciadores randômicos (AP-PCR) se mostra válida em identificar genotipicamente microrganismos. A vantagem do AP-PCR frente às demais técnicas de genotipagem é permitir a amplificação de segmentos aleatórios do DNA microbiano, sem, no entanto, haver a necessidade de um conhecimento prévio da sequência analisada. Essa técnica se diferencia do PCR convencional por permitir que oligonucleotídeos iniciadores de aproximadamente 10 pares de bases se liguem nas sequências-alvo de DNA, sob baixa temperatura de anelamento. Como resultado dessa baixa especificidade, a ligação entre os oligonucleotídeos iniciadores e sua sequência-alvo não é perfeita, e este se liga, aleatoriamente, em regiões não específicas do DNA, amplificando-as. A presença ou ausência dessas bandas de DNA amplificado são utilizadas na comparação entre microrganismos. Autores (62) mostraram que a técnica de AP-PCR pode ser eficaz em diferenciar genótipos de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. Este estudo mostra uma heterogeneidade genética entre cepas de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* dentro do mesmo indivíduo.



Os estreptococos mutans podem secretar três tipos diferentes de glicosiltransferase: GTF-1, GTF-S e GTF-SI. O primeiro catalisa a formação de glucanos insolúveis em água e, nos *Streptococcus mutans*, o GTF-1 é codificado pelo gene *gtf B*, e nos *Streptococcus sobrinus*, pelo gene *gtf I*. Primers específicos foram desenvolvidos para ambos os genes e, assim, é possível distinguir essas duas bactérias (65).

Em relação à diversidade genotípica de *Streptococcus mutans* em pessoas com SD, Cogulu e cols. (66) investigaram a prevalência de cárie em 60 crianças com SD e a diferença entre genótipos de *Streptococcus mutans* na saliva destes indivíduos comparados a 64 crianças sem a síndrome. O estudo mostrou uma menor prevalência de cárie nas crianças com SD, e por meio de AP-PCR encontrou todos os perfis genotípicos diferentes entre as crianças com e sem a síndrome. O estudo encontrou três diferentes perfis genotípicos nas crianças com SD, e oito naquelas sem a síndrome, sendo que a relação entre os diferentes perfis genotípicos e a prevalência de cárie foi estatisticamente significativa. Os autores sugerem que a baixa prevalência de cárie encontrada pode ser devida à menor colonização por cepas cariogênicas de *Streptococcus mutans* nas crianças com a síndrome ou à diferença de acidogenicidade e aciduridade entre as cepas de crianças com e sem a síndrome. Entretanto, isso não foi avaliado.

Outro estudo (67) avaliou a possibilidade de similaridade intrafamiliar de cepas de *Streptococcus mutans* entre crianças com SD e suas mães. O trabalho foi feito com cinco crianças com SD com média de idade de 10 anos e suas respectivas mães, comparando com uma criança sem a síndrome com seis anos de idade e sua mãe. A partir de saliva não estimulada, foi feito o crescimento de *Streptococcus mutans*. Foram selecionadas três colônias de cada participante e feito AP-PCR. *Streptococcus mutans* foi encontrado em todos os participantes (n=12), enquanto que *Streptococcus sobrinus* não estava presente em nenhum. Os achados do estudo mostraram que a criança sem SD teve um genótipo de *Streptococcus mutans* muito semelhante ao encontrado na sua mãe, concordando com a hipótese demonstrada previamente por outros autores (68) que esta bactéria é transmitida de mãe para filho. Entretanto, nas crianças com SD, nenhum genótipo foi semelhante entre mãe e filho, sugerindo que a transmissão desta bactéria acontece por outra pessoa.

Os *Streptococcus mutans* possuem uma série de características relacionadas ao início da cárie. Uma delas refere-se à capacidade imediata de transportar açúcares fermentáveis quando em competição com outras bactérias do biofilme, e a conversão de tais açúcares em ácidos. Os *Streptococcus mutans* possuem diversos sistemas de transporte de açúcar, incluindo os sistemas de fosfoenol-piruvato-fosfotranferase de alta afinidade que são capazes de captar açúcar quando presentes no ambiente oral apenas em baixas concentrações. Além disso, esses microrganismos têm a habilidade de manter o metabolismo do açúcar sob condições ambientais extremas, como no pH baixo. Poucas bactérias são capazes de tolerar condições acidogênicas por períodos prolongados. Entretanto, os *Streptococcus mutans* não apenas permanecem viáveis no pH baixo, mas também crescem e metabolizam, isto é, são tanto acidogênicos quanto acidúricos (49).

Diferenças genótípicas podem estar relacionadas com diferenças de virulência entre cepas de *Streptococcus mutans*. Uma característica importante de *Streptococcus mutans* em promover o desenvolvimento da cárie é a capacidade de aderir firmemente à superfície do dente na presença de sacarose (52), e esta adesão é mediada principalmente pela ação das enzimas glicosiltransferases (gtf). Estas enzimas são consideradas fundamentais para a virulência de *Streptococcus mutans* na patogênese da cárie dentária (69). Pesquisas mostraram diferenças nos fatores de virulência entre os isolados de *Streptococcus mutans* (70, 71). Diferenças na síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água (PEC) podem estar associadas a diferentes níveis de virulência. Isto é importante, uma vez que tem sido demonstrado que PEC produzido a partir da sacarose modifica as propriedades estruturais do biofilme dental, incluindo aumento da porosidade da matriz do biofilme (72), tornando-o mais cariogênico.

Paddick e cols. (73) mostraram que as proporções de *Streptococcus mutans* e lactobacilos eram elevadas no biofilme dental de indivíduos com cárie, enquanto *A. naeslundii* formavam uma proporção significativamente maior da microbiota de indivíduos livres de cárie. Estes resultados mostram que as amostras de biofilme estavam expostas a diferentes ambientes e, conseqüentemente, diferentes estresses.

Redmo-Emanuelsson e cols. (74) avaliaram treze adultos entre 20 e 40 anos de idade e encontraram um máximo de sete genótipos de *Streptococcus mutans* em indivíduos que tiveram experiência de cárie. Resultados semelhantes ao estudo de

Napimoga e cols. (70) que encontrou um máximo de oito genótipos em indivíduos jovens com experiência de cárie utilizando AP-PCR. Além disso, os autores investigaram a diversidade genética e fatores de virulência de *Streptococcus mutans* em 16 adultos (8 com e 8 sem atividade de cárie). O trabalho mostrou uma maior diversidade genotípica desse microrganismo naqueles com atividade de cárie. Em relação aos fatores de virulência analisados, o pH final das culturas e a capacidade de se aderir à superfície dura não mostrou diferença entre adultos com e sem atividade de cárie. Entretanto, os autores observaram que genótipos de *Streptococcus mutans* isolados de sítios com cárie ativa apresentavam maior habilidade para sintetizar polissacarídeo extracelular insolúvel quando comparados aos genótipos presentes em sítios livres de cárie.

A existência de vários genótipos em biofilme cariogênico poderia ser meramente uma consequência de circunstâncias favoráveis para o *Streptococcus mutans* neste biofilme, mas é possível que a ação simultânea de diferentes genótipos com distintos potenciais de virulência aumente o risco de cárie.

#### 1.12 Objetivos

1. Conduzir uma revisão sistemática de literatura para verificar se existem evidências científicas que suportem a hipótese que pessoas com síndrome de Down têm menor experiência de cárie do que indivíduos sem a síndrome (artigo 1).

2. Avaliar a experiência de cárie e contagens salivares de *Streptococcus mutans* de pessoas com síndrome de Down comparando com indivíduos sem a síndrome da mesma faixa-etária (artigo 2).

3. Verificar a diversidade genotípica de *Streptococcus mutans* e sua acidogenicidade em pessoas com síndrome de Down comparando com indivíduos sem a síndrome (artigo 3).

2 ARTIGO CIENTÍFICO: DENTAL CARIES IN INDIVIDUALS WITH DOWN SYNDROME: A SYSTEMATIC REVIEW.

Este manuscrito está disponível em:

*International Journal of Paediatric Dentistry* 2016 Jan; 26 (1): 3-12

3 ARTIGO CIENTÍFICO: ORAL HEALTH STATUS AND SALIVARY LEVELS OF  
MUTANS STREPTOCOCCI IN CHILDREN WITH DOWN SYNDROME

Este manuscrito está disponível em:

*Pediatric dentistry* 2015 Jul-Aug; 37(4):355-60

4 ARTIGO CIENTÍFICO: ACIDOGENICITY AND GENOTYPIC DIVERSITY OF  
*STREPTOCOCCUS MUTANS* IN DOWN SYNDROME CHILDREN RELATED TO  
DENTAL CARIES STATUS

## Abstract

**Objective:** *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) is considered one of the main etiological factors for the development of dental caries, being significantly elevated in cariogenic biofilms. Down Syndrome (DS) patients often have high salivary counts of this microorganism. However, has not been related to a higher incidence of dental caries in this subpopulation as compared to non-syndromic patients. The aim of the present study was to evaluate the genotypical diversity and the acidogenicity of *S. mutans* associated with dental caries experience of DS children versus non-DS controls.

**Design:** Seventeen children between 6-12 years old were selected for the study and divided in One genotype present in both groups was associated with a caries-free individuals ( $P < 0.05$ ). No significant difference was found in the association between each genotype and the presence or absence of DS ( $P > 0.05$ ). The acidogenicity of the genotypes found in DS children was significantly smaller ( $P < 0.05$ ) than in the control group. However, the acidogenicity of each *S. mutans* genotype was not associated with the presence or absence of caries experience ( $P > 0,05$ ).two groups: DS (n=9) and non-DS controls (n=8). All the participants had high salivary counts of *S. mutans* (higher than  $2.5 \times 10^5$  CFU/mL), whereas 5 from each group were caries-free and the remainder had elevated caries experience (DMFS or dmfs  $\geq 7$ ). *S. mutans* isolates were obtained from each participant and 99 strains were confirmed through PCR. In total, 50 strains were obtained from DS patients and 49 from the control group. The genotypical profile of the isolates were analysed with the AP-PCR methodology. The acidogenicity of a representative strain from each genotype of *S. mutans* was evaluated.

**Results:** DS children had 16 different *S. mutans* genotypes, while the control group had 21. Twelve genotypes were present in both groups, 4 were DS exclusive and 9 were found only in the control group.

**Conclusion:** The results of the present study suggest that DS children have *S. mutans* genotypes with lower acidogenicity than non-DS children.

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

## 1. Introduction

Down syndrome (DS) is a genetic anomaly caused by the presence of a third chromosome (partial or total) in the 21<sup>st</sup> chromosomal pair (trisomy 21) (Arumugam et al., 2016). It is the most common genetic anomaly in human beings of all ethnicities and socioeconomic levels, with an incidence of 1 in every 1000 new-borns (Fitzgerald, Leonard, Pikora, Bourke, & Hammond, 2013). DS may lead to several alterations in the mouth cavity, such as agenesis, conoid teeth, diastema, hypoplasia, delayed dental eruption, bruxism, among others (Desai, 1997). Regarding dental caries, studies have demonstrated a lower caries experience in DS subjects when compared to non-DS subjects (Areias et al., 2012; Cogulu, Sabah, Kutukculer, & Ozkinay, 2006; Shapira, Stabholz, Schurr, Sela, & Mann, 1991). However, other studies did not find this between-group difference (Mathias, Simionato, & Guaré, 2011; Moreira, Schwertner, Grando, Faccini, & Hashizume, 2015; Oredugba, 2007). Recently, a systematic review revealed that even though the majority of studies have found a lower caries experience in DS than non-DS patients, the lack of control over confounding factors such as diet, oral hygiene habits, source of patients (institutionalized or not) and number of teeth (due to the natural delayed teeth eruption in DS patients), reduces the results reliability (Moreira, Schwertner, Jardim, & Hashizume, 2016).

Although no microorganism has been entirely associated with the dental caries initiation and progression (Aas et al., 2008), several studies have shown a relation between high counts of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) and dental caries lesions (Abbate, Borghi, Passi, & Levrini, 2014; Loesche, 1986). Authors (Zickert, Emilson, & Krasse, 1983) evaluated the correlation between the *S. mutans* infection levels and the dental caries incidence. A higher incidence of dental caries was found when the levels of this microorganism were superior to  $2.5 \times 10^5$  *S. mutans* per mL of saliva. Few studies have investigated the levels of *S. mutans* in the saliva of DS patients and the results are controversial. Whereas some studies have found no difference between the levels of *S. mutans* in DS and non-DS patients (Stabholz et al., 1991), authors (Areias et al., 2012) have found lower saliva levels of this microorganism in DS patients. Moreover, studies have found a higher frequency of DS patients has dental caries experience with high levels of *S. mutans* in the saliva than non-DS controls (Mathias et al., 2011; Moreira et al., 2015).



The correlation between the dental caries activity and genotype is also controversial. While authors (Alaluusua et al., 1996; Zhou, Qin, Qin, & Ge, 2011) have demonstrated that a higher genotypical diversity of *S. mutans* is found in subjects with dental caries experience than in caries-free individuals, other authors have found the opposite result (Kreulen, de Soet, Hogeveen, & Veerkamp, 1997). Some authors (Cogulu, Sabah, Uzel, & Ozkinay, 2006) investigated the dental caries prevalence in children with DS and the genotypical difference of *S. mutans* in the saliva of DS versus non-DS children. Lower dental caries prevalence and less genotypical profiles (evaluated through AP-PCR) was found in DS subjects than in non-DS controls. It was suggested that the lower dental caries prevalence in DS subjects might be due to a smaller colonization of *S. mutans* cariogenic strains or to the difference in acidogenicity and acidity between strains in DS or non- DS children, even though this was not validated.

Several *S. mutans* characteristics are associated to its cariogenicity. An important one is the capacity to transport immediately fermentable sugars when in competition with other bacteria in the biofilm, and the conversion of sugar into acids. These microorganisms have the ability to maintain sugar metabolism under extreme conditions, e.g. low pH. Few bacteria are able to tolerate acidogenic conditions for a long period. *S. mutans* is not only able to stay viable under low pH, but it is also able to grow and keep the metabolism active, being considered acidogenic and acidic (Loesche, 1986; Loesche, Rowan, Straffon, & Loos, 1975). No studies have been performed in order to evaluate the *S. mutans* acidogenicity in DS subjects.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the *S. mutans* genotypical diversity and acidogenicity associated with dental caries experience in DS and non-DS children.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Ethical considerations

The present study was approved by the Ethics in Research Committee from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocol number 23.211) and by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (protocol number 12.0166).

### 2.2. Samples source

The clinical examination and saliva sampling for the identification of *S. mutans* was performed as previously described (Moreira et al., 2015). In the aforementioned study, 131 children aged between 6-12 were screened. Sixty subjects had DS and 71 were non-DS controls. Forty-two DS and 70 control subjects had their stimulated saliva sampled. The fresh samples from volunteers were serially diluted ( $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$ ) in sterile saline solution. Afterwards, 25  $\mu$ L of fresh saliva from both groups and from each dilution were seeded in Petri dishes containing mitis salivarius agar enriched with sucrose 5% and bacitracin 0.2 IU/mL in order to promote the growth of *S. mutans*. The dishes were incubated at 37°C during 48h in microaerophilia (Shklair & Keene, 1974). After incubation, *S. mutans* colonies were identified and counted by means of a stereomicroscope to determine the number of colony forming units per mL (CFU/mL). Fifteen *S. mutans* representative colonies of each children were selected and frozen in BHI-glycerol for posterior analysis (Tabchoury et al., 2008).

### 2.3. Sample selection

Only the volunteers that had *S. mutans* salivary counts above  $2.5 \times 10^5$  CFU/mL (Zickert et al., 1983) were included. This was the cut point defined for elevated levels of salivary *S. mutans*. From the 112 subjects that had their saliva sampled in the previous study, 46 had counts above the cut point, 19 being from the DS and 27 non-DS group. Seven of the DS and 9 non-DS were caries-free (DMFS=dmfs=0). Among the children that had dental caries experience (12 DS and 18 non-DS), only the ones who presented high levels of dental caries experience (DMFS  $\geq$  7 or dmfs  $\geq$  7) were selected. This criteria was randomly chosen in accordance with the previous study where the clinical examinations and saliva sampling were performed (Moreira et al., 2015). Subjects with intermediate values of (DMFS or dmfs  $\leq$  6) were excluded, since in this study only extreme cases were evaluated (caries-free or with high levels of dental caries experience).

### 2.4. Genomic DNA extraction and PCR

For the streptococcus genomic DNA extraction, the isolates were thawed in ambient temperature. Samples aliquots were seeded in Petri dishes containing BHI agar (Difco, Sparks, MD, USA) and incubated for 24h in microaerophilia. The colony samples were stained through Gram technique for morphological confirmation. Afterwards, the presumptive *S. mutans* colonies were collected and transferred to

centrifuge microtubes containing 50 µL of ultra-pure sterile water. The microtubes were vigorously mixed in vortex to allow the mechanical disruption of the bacterial cell wall. A PCR with the oligonucleotides primers species-specific was performed for *gtfB* (5'-ACTACACTTTCGGGTGGCTTGG-3' e 5'CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC-3') in order to confirm the *S. mutans* identity (Damé-Teixeira, Arthur, Parolo, & Maltz, 2014). For the assay, it was used 37,25 µL of ultra-pure water, 5 µL of PCR buffer 10x, 2.5 µL of MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1.5 µL of oligonucleotides primers R 10 mM, 1.5 µL of oligonucleotides primers F 10 mM, 1 µL of dNTP, 0.25 µL of Taq polymerase 5U/µL and 1 µL of DNA. The samples were mixed and inserted in a thermocycler (TC 412, Techne, Burlington, NJ, USA) with the following conditions: 95°C cycle during 5 minutes for initial denaturation, followed by 30 cycles of 30 seconds at 95°C for denaturation, 59°C during 30 seconds to promote annealing and 72°C for 1 minute for final elongation. As a positive control, the *S. mutans* UA159 strain (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) was used.

PCR products were analysed through agarose gel electrophoresis 2% stained with SYBR Green 1.6% at 100V, 120Ma, 100W for 30 min. The presence of an unique band for each strain was analysed under UV light (Damé-Teixeira et al., 2014). All the reagents were provided by Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

#### 2.5. Genotypical analysis of *Streptococcus mutans* through AP-PCR

Strains identified as *S. mutans* were genotypically analysed by the *Arbitrarily primed - Polymerase Chain Reaction* (AP-PCR). AP-PCR was performed using 35.5 µL of ultra-pure water, 5 µL of buffer, 3.5 µL of MgCl<sub>2</sub>, 1 µL of dNTPs, 2 µL of oligonucleotides primers, 1 U of Taq polymerase and 2 µL of DNA template. The applied oligonucleotides primers were OPA 2 (5'-TGCCGAGCTG-3') as election primer and OPA 03 (5'-AGTCAGCCAC-3') for confirmation (Truong, Ménard, Mouton, & Trahan, 2000). In every AP-PCR, the purified genomic DNA of the *S. mutans* UA159 strain was used as a positive control. The AP-PCR reaction was performed using a thermocycler (TC 412, Techne, Burlington, NJ, USA) with the following conditions for OPA 02: 95°C cycle during 2 minutes for initial denaturation, followed by 45 cycles of 30 seconds at 94°C for denaturation, 36°C during 30 seconds to promote annealing and 72°C for 1 minute for elongation and 72°C for 5 minutes for final elongation. OPA 03 reaction was carried out with 95°C cycle during 2 minutes for initial denaturation, followed by 30 cycles of 1 min at 94°C for

denaturation, 32°C during 1 min to promote annealing and 72°C for 2 minutes for elongation and 72°C for 5 minutes for final elongation (Tabchoury et al., 2008).

AP-PCR products were analysed through agarose gel electrophoresis 1% stained with SYBR Green 1.6% at 96V during 4h. A molecular weight control (250pb) was applied in 3 gel slots for further comparison with the generated fragments. AP-PCR images were obtained with a digital camera (Canon Inc., Tokyo, Japan) and stored as Image File Format for visual analysis.

### 2.6. *Streptococcus mutans* acidogenicity

A representative strain of each genotype obtained through AP-PCR was analysed measuring its capacity to ferment glucose, reducing the pH through glycolysis (Arthur et al., 2011).

For this purpose, each *S. mutans* genotype was seeded in BHI agar and incubated at 37°C during 48h. Afterwards, the culture was cultivated in 10 mL of BHI broth with glucose 1% during 18h at 37° inside a falcon tube. The tube was centrifuged at 3000 rpm during 10 min. The supernatant was removed and resuspended in 1 mL of KCl/MgCl<sub>2</sub>. The tube was vigorously mixed and the content transferred to a microtube, which was centrifuged at 12000 rpm during 5 min. The supernatant was removed and resuspended in 2 mL of phosphate buffer in a falcon tube and incubated during 1h at 37°C. The tube was then centrifuged at 3000 rpm during 10 min. The supernatant was removed and washed with 2 mL of KCl/MgCl<sub>2</sub>, centrifuged at 3000 rpm for 10 min and washed again with KCl/MgCl<sub>2</sub> in order to start the pH measurements. The time 0 was measured and when necessary, the pH was adjusted to 7 with NaOH. 0.2 mL of glucose 5% was added to start counting at time 5, 10, 15, 30, 60, 120 and 180 min (Arthur et al., 2013). A pH curve in function of time was constructed for each isolate. *S. mutans* UA159 strain was used as a positive control in all assays.

### 2.7. Data analysis

The genotypical analysis of each isolate was visually compared by two researchers (MJSM e APDO) in an independent manner. The band distribution pattern was observed using the molecular weight control as reference (ladder). In case of disagreement, a consensus was reached with a third researcher (CCFP). The same genotypical identity was considered when identical profiles were matched with

the AP-PCR product. A descriptive analysis for each genotype was performed for each volunteer.

Acidogenicity of each isolate was represented through pH value in function of time curves. Graphs for each genotype were obtained with the same height and length. Each graph was individually transferred to UTHSCSA Image Tool software version 3.0. A standard measurement was created to analyse the data in centimetres. The area under the curve (AUC) was manually delimited two times by the same researcher and the average of the areas was obtained. The AUC was calculated considering pH 3 as threshold between 0 and 180 min. The acidogenicity was expressed by the AUC (cm<sup>2</sup>). The procedure was performed in duplicates.

Association between each obtained genotype with having or not the dental caries experience, and the association between the presence of each genotype with having or not DS were made using the chi-square test. The comparison between acidogenicity of each obtained genotype with having or not DS, and the comparison between the acidogenicity of each genotype with having or not the dental caries experience was performed through the Mann-Whitney *U* test (SPSS version 20.0, Chicago, USA), considering a *P*-value <0.05 as significant.

### 3. Results

In the 42 DS subjects, 19 had high salivary counts of *S. mutans* (higher than  $2.5 \times 10^5$ ). From the high-count subjects, 6 were excluded due to DMFS  $\leq$  6 or dmfs  $\leq$  6. In the non-DS group, from the 70 children that had their saliva collected, 27 had high-counts of *S. mutans* and 6 were excluded due to DMFS  $\leq$  6 or dmfs  $\leq$  6. The sample selection process is depicted on Figure 1.

In total, this study had 17 participants: 9 DS and 8 non-DS children. All the subjects had high salivary counts of *S. mutans* (higher than  $2.5 \times 10^5$  CFU/mL of saliva). Regarding the dental caries experience, it was present in 4 DS and 3 non-DS subjects. Ten subjects (n=5 of each group) were caries-free in the deciduous and permanent teeth. Samples characterization from children with or without DS, dental caries experience distribution and salivary counts of *S. mutans*, is shown in Table 1.

Initially, 510 *S. mutans* isolates were obtained from 13 DS and 21 non-DS subjects (15 per subject). The subjects without viability in any of the isolates were excluded from the study (n=17, 4 DS and 13 non-DS). Even though 15 isolates of *S. mutans* were obtained through salivary sampling from each subject, 117 isolates

were still viable for genotypical diversity analysis. From these, 99 were identified as *S. mutans* via species-specific PCR. Fifty isolates belonged to DS and 49 to non-DS subjects. The distribution of the number of isolates per children, number of genotypes and each genotype frequency is demonstrated on Table 2.

In total, 25 genotypes were identified, 16 in DS and 21 in non-DS subjects. Four genotypes were DS exclusive (c, f, u, z), whereas 9 were present only in non-DS subjects (d, i, j, m, n, p, q, r, s). Interestingly, 1 genotype (k) was identified only in subjects with caries experience and 2 genotypes (o, v) only in subjects caries-free. The “o” genotype was significantly associated with not having the dental caries experience ( $P<0,05$ ). The association between the presence of each genotype and being a DS or non-DS subject was not significant. A representative genotypical diversity of *S. mutans* isolates obtained with the AP-PCR technique, using the OPA-02 primer, is depicted on Figure 2. The average band number present in each genotype was 4 (varying between 1 and 8). The same genotypical analysis was repeated on the 99 isolates in order to confirm the results, using OPA-03 primer.

The acidogenicity from a representative strain of each genotype was evaluated. AUC average for the 25 genotypes was  $41,37 \pm 6,31 \text{ cm}^2$ , varying from  $32,07 \text{ cm}^2$  for the most acidogenic genotype to  $56,00 \text{ cm}^2$  for the less acidogenic. The acidogenicity comparison between genotypes obtained from DS and non-DS subjects is shown in Table 3. DS subjects had a significantly higher AUC ( $P<0,05$ ) as compared to non-DS subjects, demonstrating a lower pH decrease in function of time for the analysed genotypes. No significant difference was found when comparing the experience of having dental caries experience or not with the acidogenicity of each *S. mutans* genotype.

#### 4. Discussion

In the present study, DS and non-DS children with high salivary counts of *S. mutans* (caries-free or high dental caries experience) were compared to the genotypical diversity of this microorganism and the acidogenicity of its different genotypes. DS subjects had a lower genotypical diversity than non-DS subjects (Table 2). Moreover, the acidogenicity of this microorganism was significantly lower in the genotypes found in DS subjects (Table 3), being less virulent.

Although previous studies have shown that DS patients have less dental caries experience than non-DS subjects, other studies did not find this difference.

However, some studies reported a higher frequency of DS subjects with high salivary counts of *S. mutans* and dental caries experience when compared to non-DS subjects with dental caries experience (Mathias et al., 2011; Moreira et al., 2015). Another study reported that in DS subjects, this microorganism produces high amounts of extracellular polysaccharide (EPS) (Schwertner, Moreira, Faccini, & Hashizume, 2016). This compound is a product of sucrose metabolism, promoting microbial adhesion, increasing the biofilm thickness and consequently, increasing the porosity for acid diffusion. Furthermore, different *S. mutans* genotypes may have different expression levels of glycosyltransferase and higher EPS production (Bowen & Koo, 2011). A study conducted by Areias et al. (2012) demonstrated that DS subjects have a lower salivary flow than non-DS subjects (Areias et al., 2012). All these combined factors can lead to a higher dental caries experience in the DS population. Thus, different mechanisms might play a role in caries protection in these subjects.

In the past years, the available technologies for identification of oral bacteria have become more sophisticated. The identification of bacterial DNA through arbitrary primers (AP-PCR) technique is widely used since it is simple, fast and accurate (Oho, Yamashita, Shimazaki, Kushiya, & Koga, 2000; Saarela, Hannula, Mättö, Asikainen, & Alaluusua, 1996). To our knowledge, only two studies have applied AP-PCR for the identification of *S. mutans* in DS subjects (Barone, Macedo, & Marin, 2005; Cogulu, Sabah, Uzel, et al., 2006).

Barone et al. evaluated if there was an intra-familial similarity of *S. mutans* strains between DS children and their mothers (Barone, Macedo, & Marin, 2005). Using AP-PCR, the authors demonstrated that a non-DS subject (control) had a *S. mutans* genotype very similar to the one found in their mothers. This finding was in agreement with the previous published research that demonstrated that the bacteria transmission occurred from the mother to the child (Caufield, Cutter, & Dasanayake, 1993). However, in DS children, there was no similarity between the bacteria genotype of mother and child, suggesting that the transmission might occur via a different person.

Cogulu et al. analysed the dental caries experience and the genotypical diversity of *S. mutans* in DS and non-DS children (Cogulu, Sabah, Uzel, et al., 2006). The study has found less dental caries experience in DS children. Additionally, through AP-PCR, demonstrated all the different genotypical profiles between DS and

non-DS children. Three different genotypical profiles were found in DS children and 8 in non-DS children, and the correlation of the different genotypical profiles with the dental caries prevalence was significant. The present study also demonstrated a reduced genotypical diversity in DS children (16 in DS versus 21 in non-DS children). The higher genotypical variety found might be explained to the selection criteria, that included only children with high salivary counts of *S. mutans*. In contrast to the aforementioned study, from the 25 different genotypes identified, 12 were present in DS and non-DS children. Nine genotypes were only found only in non-DS children, whereas 4 were found in DS children. This finding demonstrates that the microenvironment present in the oral cavity of DS subjects might favour the colonization and selection of specific genotypes capable of surviving in this oral environment.

A maximum of 8 genotypes was found in one subject, what is in agreement with the study performed previously (Redmo Emanuelsson, Carlsson, Hamberg, & Bratthall, 2003) that evaluated 13 adults and have found a maximum of 7 different *S. mutans* genotypes in one subject, whereas in other study (Napimoga et al., 2004) a maximum of 8 genotypes were found (n=16, 8 with dental caries and 8 caries-free). Nonetheless, more relevant results would be demonstrated if not only the different genotypes of the microorganism were described, but also the related virulence factors.

It was already hypothesized that the stressful conditions that the bacteria of an individual with dental caries is subjected would lead to a lower genotypical variety with a higher resistance, due to the unfavourable environmental conditions. Some authors have demonstrated that children with dental caries experience had only one *S. mutans* genotype, whereas the caries-free control group had 2-5 genotypes (Kreulen et al., 1997). The authors suggest that the environmental stress caused by the disease leads to lack of nutrients, acid pH, organic acids exposition, selecting the more cariogenic strains. In contrast, others studies showed a higher *S. mutans* genotypical diversity in subjects with dental caries than caries-free (Napimoga et al., 2004). Another study suggested that children with dental caries activity and high frequency of sugar consumption have more *S. mutans* diversity when compared to caries-free children (Alaluusua et al., 1996). These findings were justified due to the frequent consumption of fermentable carbohydrates, leading to an intense colonization and growth of different genotypes. It is also possible that the



simultaneous action of various strains with different cariogenic potentials would increase the risk of dental caries development. In the present study, comparisons between having or not the dental caries experience and the acidogenicity of each *S. mutans* genotype were performed, without significant results. Only one of the obtained genotypes was significantly associated with not having dental caries experience. This genotype was present in both DS and non-DS subjects, demonstrating that less virulent genotypes may be present in the oral microflora independently of having the syndrome or not. One genotype was only present in subjects with dental caries, in the two groups.

Authors (Cogulu, Sabah, Uzel, et al., 2006) suggested that the low dental caries prevalence in the study might be due to a lower colonization of cariogenic *S. mutans* strains in DS children or to the acidogenicity or aciduricity between strains present in DS and non-DS children. However, this was not investigated. The present study demonstrates that DS subjects have *S. mutans* genotypical profiles with lower acidogenicity than non-DS subjects, what could explain the reason why this population does not have a higher dental caries experience than non-DS subjects.

In conclusion, the present study suggests that children with DS have less acidogenic genotypes of *S. mutans* when compared to non-DS children.

Conflicts of interest: the authors declare no conflicts of interest.

## References

- Aas, J. A., Griffen, A. L., Dardis, S. R., Lee, A. M., Olsen, I., Dewhirst, F. E., . . . Paster, B. J. (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol*, 46(4), 1407-1417.
- Abbate, G. M., Borghi, D., Passi, A., & Levrini, L. (2014). Correlation between unstimulated salivary flow, pH and streptococcus mutans, analysed with real time PCR, in caries-free and caries-active children. *Eur J Paediatr Dent*, 15(1), 51-54.
- Alaluusua, S., Mättö, J., Grönroos, L., Innilä, S., Torkko, H., Asikainen, S., . . . Saarela, M. (1996). Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. *Arch Oral Biol*, 41(2), 167-173.
- Areias, C., Sampaio-Maia, B., Pereira, M. e. L., Azevedo, A., Melo, P., Andrade, C., & Scully, C. (2012). Reduced salivary flow and colonization by mutans streptococci in children with Down syndrome. *Clinics (Sao Paulo)*, 67(9), 1007-1011.

- Arthur, R. A., Cury, A. A., Graner, R. O., Rosalen, P. L., Vale, G. C., Paes Leme, A. F., Cury J.A., Tabchoury, C. P. (2011). Genotypic and phenotypic analysis of *S. mutans* isolated from dental biofilms formed in vivo under high cariogenic conditions. *Braz Dent J*, 22(4), 267-274.
- Arthur, R. A., Waeiss, R. A., Hara, A. T., Lippert, F., Eckert, G. J., & Zero, D. T. (2013). A defined-multispecies microbial model for studying enamel caries development. *Caries Res*, 47(4), 318-324.
- Arumugam, A., Raja, K., Venugopalan, M., Chandrasekaran, B., Kovanur Sampath, K., Muthusamy, H., & Shanmugam, N. (2016). Down syndrome-A narrative review with a focus on anatomical features. *Clin Anat*, 29(5), 568-577.
- Barone, S., Macedo, C., & Marin, J. M. (2005). Arbitrarily primed polymerase chain reaction for fingerprinting the genotype identification of mutans streptococci in children with Down syndrome. *Spec Care Dentist*, 25(1), 37-42.
- Caufield, P. W., Cutter, G. R., & Dasanayake, A. P. (1993). Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res*, 72(1), 37-45.
- Cogulu, D., Sabah, E., Kutukculer, N., & Ozkinay, F. (2006). Evaluation of the relationship between caries indices and salivary secretory IgA, salivary pH, buffering capacity and flow rate in children with Down's syndrome. *Arch Oral Biol*, 51(1), 23-28.
- Cogulu, D., Sabah, E., Uzel, A., & Ozkinay, F. (2006). Genotyping of Streptococcus mutans by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down Syndrome. *Arch Oral Biol*, 51(3), 177-182.
- Damé-Teixeira, N., Arthur, R. A., Parolo, C. C., & Maltz, M. (2014). Genotypic diversity and virulence traits of Streptococcus mutans isolated from carious dentin after partial caries removal and sealing. *ScientificWorldJournal*, 2014, 165201.
- Desai, S. S. (1997). Down syndrome: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 84(3), 279-285.
- Fitzgerald, P., Leonard, H., Pikora, T. J., Bourke, J., & Hammond, G. (2013). Hospital admissions in children with down syndrome: experience of a population-based cohort followed from birth. *PLoS One*, 8(8), e70401.
- Kreulen, C. M., de Soet, H. J., Hogeveen, R., & Veerkamp, J. S. (1997). Streptococcus mutans in children using nursing bottles. *ASDC J Dent Child*, 64(2), 107-111.
- Loesche, W. J. (1986). Role of Streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiol Rev*, 50(4), 353-380.
- Loesche, W. J., Rowan, J., Straffon, L. H., & Loos, P. J. (1975). Association of Streptococcus mutants with human dental decay. *Infect Immun*, 11(6), 1252-1260.
- Mathias, M. F., Simionato, M. R., & Guaré, R. O. (2011). Some factors associated with dental caries in the primary dentition of children with Down syndrome. *Eur J Paediatr Dent*, 12(1), 37-42.
- Moreira, M. J., Schwertner, C., Grando, D., Faccini, L. S., & Hashizume, L. N. (2015). Oral Health Status and Salivary Levels of Mutans Streptococci in Children with Down Syndrome. *Pediatr Dent*, 37(4), 355-360.
- Moreira, M. J., Schwertner, C., Jardim, J. J., & Hashizume, L. N. (2016). Dental caries in individuals with Down syndrome: a systematic review. *Int J Paediatr Dent*, 26(1), 3-12.

- Napimoga, M. H., Kamiya, R. U., Rosa, R. T., Rosa, E. A., Höfling, J. F., Mattos-Graner, R., . . . Mattos-Graner, R. e. O. (2004). Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. *J Med Microbiol*, 53(Pt 7), 697-703.
- Oho, T., Yamashita, Y., Shimazaki, Y., Kushiya, M., & Koga, T. (2000). Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*, 15(4), 258-262.
- Oredugba, F. A. (2007). Oral health condition and treatment needs of a group of Nigerian individuals with Down syndrome. *Downs Syndr Res Pract*, 12(1), 72-76.
- Redmo Emanuelsson, I. M., Carlsson, P., Hamberg, K., & Bratthall, D. (2003). Tracing genotypes of *mutans streptococci* on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiol Immunol*, 18(1), 24-29.
- Saarela, M., Hannula, J., Mättö, J., Asikainen, S., & Alaluusua, S. (1996). Typing of *mutans streptococci* by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Arch Oral Biol*, 41(8-9), 821-826.
- Schwertner, C., Moreira, M. J., Faccini, L. S., & Hashizume, L. N. (2016). Biochemical composition of the saliva and dental biofilm of children with Down syndrome. *Int J Paediatr Dent*, 26(2), 134-140.
- Shapira, J., Stabholz, A., Schurr, D., Sela, M. N., & Mann, J. (1991). Caries levels, *Streptococcus mutans* counts, salivary pH, and periodontal treatment needs of adult Down syndrome patients. *Spec Care Dentist*, 11(6), 248-251.
- Shklair, I. L., & Keene, H. J. (1974). A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*, 19(11), 1079-1081.
- Stabholz, A., Mann, J., Sela, M., Schurr, D., Steinberg, D., & Shapira, J. (1991). Caries experience, periodontal treatment needs, salivary pH, and *Streptococcus mutans* counts in a preadolescent Down syndrome population. *Spec Care Dentist*, 11(5), 203-208.
- Tabchoury, C. P., Sousa, M. C., Arthur, R. A., Mattos-Graner, R. O., Del Bel Cury, A. A., & Cury, J. A. (2008). Evaluation of genotypic diversity of *Streptococcus mutans* using distinct arbitrary primers. *J Appl Oral Sci*, 16(6), 403-407.
- Truong, T. L., Ménard, C., Mouton, C., & Trahan, L. (2000). Identification of *mutans* and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Med Microbiol*, 49(1), 63-71.
- Zhou, Q., Qin, X., Qin, M., & Ge, L. (2011). Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in 3-4-year-old children with severe caries or without caries. *Int J Paediatr Dent*, 21(6), 422-431.
- Zickert, I., Emilson, C. G., & Krasse, B. (1983). Correlation of level and duration of *Streptococcus mutans* infection with incidence of dental caries. *Infect Immun*, 39(2), 982-985.

**Table 1.** Children with and without Down syndrome in relation to age, caries experience (DMF and dmf) and salivary counts of *Streptococcus mutans*.

| Subject             | Age | DMFS | dmfs | DMFT | dmft | Caries | <i>S. mutans</i> (UFC/mL) |
|---------------------|-----|------|------|------|------|--------|---------------------------|
| Children with DS    |     |      |      |      |      |        |                           |
| 1                   | 7   | 0    | 0    | 0    | 0    | NO     | 2.22x10 <sup>6</sup>      |
| 2                   | 8   | 0    | 0    | 0    | 0    | NO     | 3.14x10 <sup>6</sup>      |
| 3                   | 10  | 0    | 0    | 0    | 0    | NO     | 9.80x10 <sup>5</sup>      |
| 4                   | 10  | 0    | 0    | 0    | 0    | NO     | 7.46x10 <sup>6</sup>      |
| 5                   | 10  | 0    | 0    | 0    | 0    | NO     | 1.94x10 <sup>6</sup>      |
| 6                   | 8   | 0    | 7    | 0    | 5    | YES    | 4.50x10 <sup>6</sup>      |
| 7                   | 8   | 1    | 24   | 1    | 11   | YES    | 1.01x10 <sup>7</sup>      |
| 8                   | 12  | 4    | 45   | 3    | 10   | YES    | 2.94x10 <sup>6</sup>      |
| 9                   | 6   | n    | 52   | n    | 16   | YES    | 3.80x10 <sup>6</sup>      |
| Children without DS |     |      |      |      |      |        |                           |
| 10                  | 7   | 0    | 0    | 0    | 0    | NO     | 3.66x10 <sup>5</sup>      |
| 11                  | 12  | 0    | n    | 0    | n    | NO     | 2.28x10 <sup>5</sup>      |
| 12                  | 6   | 0    | 0    | 0    | 0    | NO     | 2.76x10 <sup>5</sup>      |
| 13                  | 10  | 0    | 0    | 0    | 0    | NO     | 3.88x10 <sup>5</sup>      |
| 14                  | 11  | 0    | 0    | 0    | 0    | NO     | 4.00x10 <sup>5</sup>      |
| 15                  | 12  | 14   | n    | 4    | n    | YES    | 5.80x10 <sup>5</sup>      |
| 16                  | 9   | 0    | 10   | 0    | 6    | YES    | 5.22x10 <sup>5</sup>      |
| 17                  | 11  | 0    | 8    | 0    | 5    | YES    | 4.28x10 <sup>5</sup>      |

DMFS: surfaces decayed, missing and filled in permanent dentition. dmfs: surfaces decayed, missing and filled in deciduous dentition. DMFT: teeth decayed, missing and filled in permanent dentition. dmft: teeth decayed, missing and filled in deciduous dentition. CFU/mL: colony forming units per milliliter. DS: Down syndrome. NA: not applicable

**Table 2.** Distribution of the number of isolates, number of genotypes and frequency of different genotypes of *Streptococcus mutans* for patients with and without Down syndrome and their caries experiences.

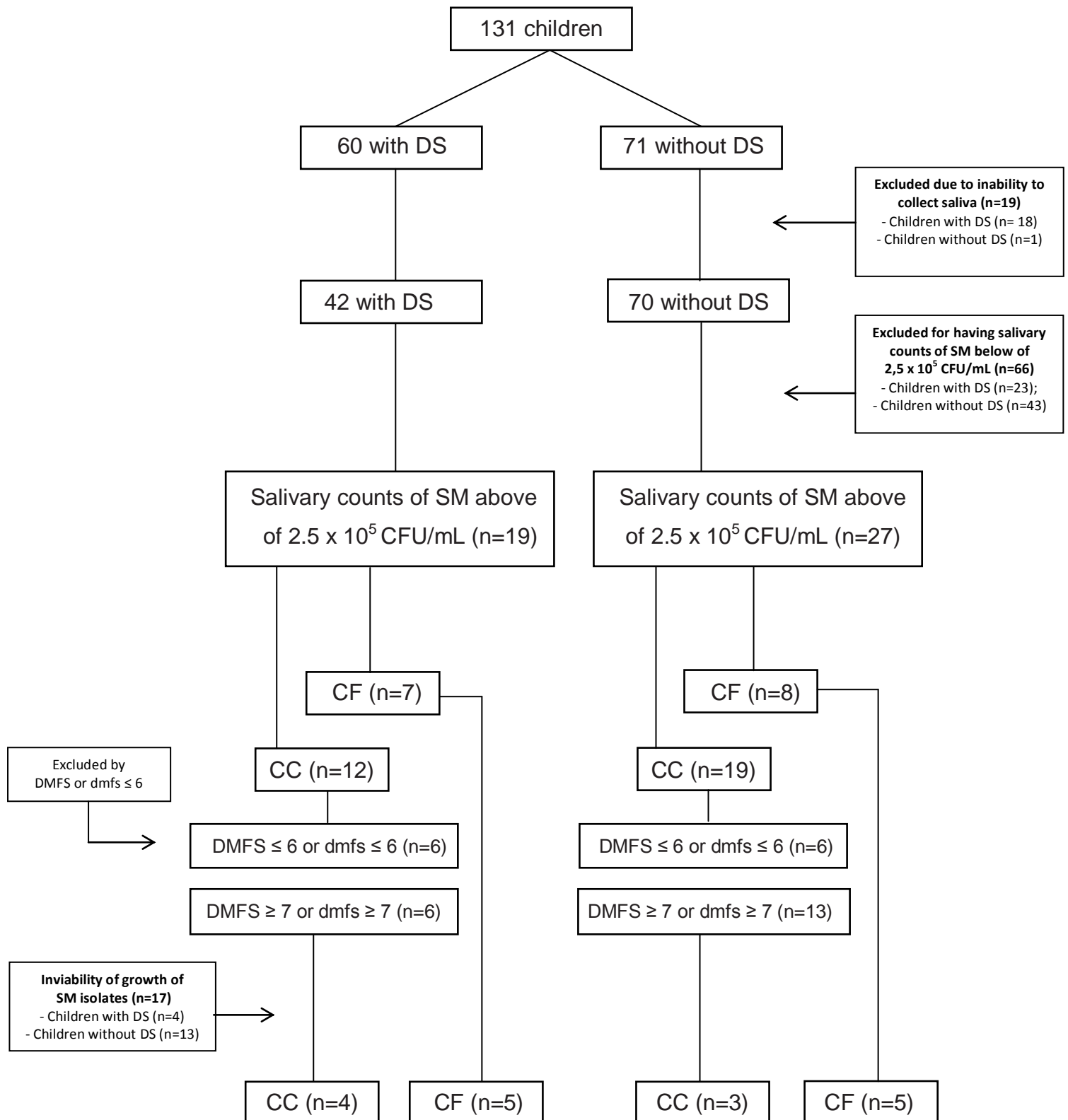
| Subject             | Caries | Isolates (n) | Genotypes (n) | Genotypes |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
|---------------------|--------|--------------|---------------|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|
|                     |        |              |               | a         | b | c | d | e | f | g | h | i | j | k | l | m | n | o  | p | q | r | s | t | u | v | w | x | z |  |
| Children with DS    |        |              |               |           |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 1                   | NO     | 12           | 7             | 3         |   |   |   | 1 |   | 1 |   |   |   |   |   |   | 3 |    |   |   |   | 2 |   | 1 |   |   | 1 |   |  |
| 2                   | NO     | 9            | 7             | 1         | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   | 1 |   |   | 3 |    |   |   |   | 1 | 1 |   |   | 1 |   |   |  |
| 3                   | NO     | 6            | 5             | 2         | 1 | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 1 |    |   |   |   |   |   |   |   |   | 1 |   |  |
| 4                   | NO     | 1            | 1             |           |   |   |   |   |   |   |   | 1 |   |   |   |   |   |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 5                   | NO     | 6            | 5             |           |   |   |   | 1 | 2 | 1 |   |   |   |   |   |   | 1 |    |   |   |   |   |   |   |   |   | 1 |   |  |
| 6                   | YES    | 4            | 3             | 2         | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   | 1 |   |   |   |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 7                   | YES    | 4            | 3             | 1         | 2 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |   |   |   | 1 |   |   |   |   |   |   |  |
| 8                   | YES    | 5            | 4             | 2         |   |   |   | 1 |   | 1 |   |   |   |   |   |   |   |    |   |   |   | 1 |   |   |   |   |   |   |  |
| 9                   | YES    | 3            | 2             | 2         |   |   |   | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
| Children without DS |        |              |               |           |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 10                  | NO     | 10           | 7             | 2         |   |   |   |   |   |   | 1 |   |   |   |   |   | 1 | 2  | 1 | 2 |   | 1 |   |   |   |   |   |   |  |
| 11                  | NO     | 15           | 8             | 1         | 1 |   |   | 2 |   |   |   |   |   | 2 |   |   | 1 |    |   | 4 |   | 2 |   |   |   | 2 |   |   |  |
| 12                  | NO     | 3            | 3             |           |   |   |   | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   | 1 |    |   |   |   |   |   | 1 |   |   |   |   |  |
| 13                  | NO     | 4            | 4             | 1         |   |   |   |   |   |   | 1 |   |   |   |   |   | 1 |    |   |   |   | 1 |   |   |   |   |   |   |  |
| 14                  | NO     | 3            | 3             |           |   |   |   | 1 | 1 |   |   |   |   | 1 |   |   |   |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 15                  | YES    | 1            | 1             |           |   |   |   | 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
| 16                  | YES    | 2            | 2             |           |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |   |   |   |   | 1 |   |   | 1 |   |   |  |
| 17                  | YES    | 11           | 8             |           |   |   |   |   |   |   |   | 1 | 1 | 1 | 2 | 3 | 1 | 1  |   |   |   |   |   |   |   |   | 1 |   |  |
| Total               |        | 99           |               | 17        | 6 | 1 | 2 | 8 | 2 | 4 | 3 | 1 | 2 | 3 | 6 | 1 | 1 | 12 | 2 | 1 | 6 | 1 | 9 | 1 | 2 | 4 | 3 | 1 |  |

DS: Down syndrome. Genotypes: Different letters correspond to different genotypes obtained with AP-PCR.

Table 3. Comparison of the acidogenicity of *Streptococcus mutans* genotypes among children with and without Down syndrome.

|                            | AUC               | P value |
|----------------------------|-------------------|---------|
|                            | median (min.-max) | 0.001*  |
| Children with DS (n=9)     | 46.48 (45-56)     |         |
| Children without DS (n=16) | 38.56 (32-44)     |         |

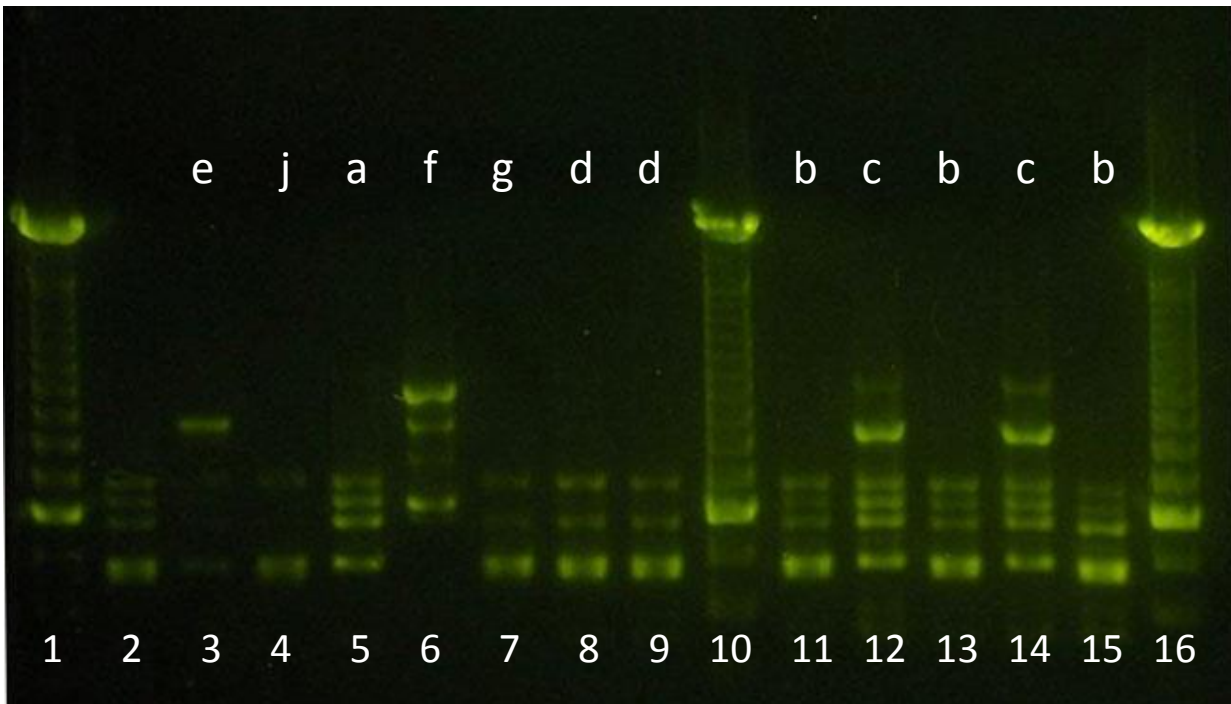
AUC: area under the curve (pH x time) in  $\text{cm}^2$ . Min: minimum. Max: maximum. DS: Down syndrome. \* Mann-Whitney *U* test.  $P < 0.05$ .



**Figure 1.** Flowchart of sample selection process.

DS: Down syndrome. SM: *Streptococcus mutans*. CFU/mL: colony forming units per milliliter.

CF: caries free. CC: with caries experience. DMFS: surfaces decayed, missing and filled in permanent dentition. dmfs: surfaces decayed, missing and filled in deciduous dentition.



**Figure 2.** Image representative of electrophoresis gel from AP-PCR using primer OPA-02 and *S. mutans* UA159 as positive control (column 2). Columns 1, 10 and 16 correspond to 250 bp DNA ladder. Different letters correspond to different genotypes.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados dos estudos da presente tese pode-se concluir que:

1. Embora muitos estudos tenham mostrado que pessoas com síndrome de Down apresentam menor experiência de cárie do que indivíduos não sindrômicos, existem falhas no desenho experimental da maioria dos estudos e, por isso, não existem evidências científicas que suportem essa hipótese.

2. Crianças com e sem síndrome de Down da mesma faixa-etária apresentam experiência de cárie similar. Entretanto, crianças com a síndrome de Down apresentam maiores contagens salivares de *Streptococcus mutans* do que crianças sem a síndrome. Além disso, crianças com síndrome de Down que têm escovação supervisionada por pais ou cuidadores apresentam menores índices de placa e sangramento gengival.

3. Crianças com síndrome de Down apresentam genótipos de *Streptococcus mutans* menos acidogênicos quando comparados aos de crianças sem a síndrome.

## REFERÊNCIAS

1. Bernal JE, Briceno I. Genetic and other diseases in the pottery of Tumaco-La Tolita culture in Colombia-Ecuador. *Clin Genet*. 2006;70(3):188-91.
2. Martinez-Frias ML. The real earliest historical evidence of Down syndrome. *Am J Med Genet A*. 2005;132A(2):231.
3. Down JL. Observations on an ethnic classification of idiots. 1866. *Ment Retard*. 1995;33(1):54-6.
4. Lejeune J, Turpin R, Gautier M. [Mongolism; a chromosomal disease (trisomy)]. *Bull Acad Natl Med*. 1959;143(11-12):256-65.
5. Jacobs PA, Baikie AG, Court brown WM, Strong JA. The somatic chromosomes in mongolism. *Lancet*. 1959;1(7075):710.
6. Shapiro BL. Whither Down syndrome critical regions? *Hum Genet*. 1997;99(3):421-3.
7. Hartway S. A parent's guide to the genetics of Down syndrome. *Adv Neonatal Care*. 2009;9(1):27-30.
8. Society NDS. Down Syndrome [acessado em 14/07/2016]. Disponível em: <http://www.ndss.org/>
9. Fitzgerald P, Leonard H, Pikora TJ, Bourke J, Hammond G. Hospital admissions in children with down syndrome: experience of a population-based cohort followed from birth. *PLoS One*. 2013;8(8):e70401.
10. Down M. Síndrome de Down 2013 [acessado em 14/07/2016]. Disponível em: <http://www.movimentodown.org.br>
11. Estatística IBdGe. População [acessado em 14/07/2016]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>.
12. Record RG, Smith A. Incidence, mortality, and dex distribution of mongoloid defectives. *Br J Prev Soc Med*. 1955;9(1):10-5.
13. Englund A, Jonsson B, Zander CS, Gustafsson J, Annerén G. Changes in mortality and causes of death in the Swedish Down syndrome population. *Am J Med Genet A*. 2013;161A(4):642-9.
14. Roizen NJ, Patterson D. Down's syndrome. *Lancet*. 2003;361(9365):1281-9.
15. Rankin J, Tennant PW, Bythell M, Pearce MS. Predictors of survival in children born with Down syndrome: a registry-based study. *Pediatrics*. 2012;129(6):e1373-81.
16. DynaMed. Down syndrome. EBSCO Publishing Web site. [acessado em 14/07/2016]. Disponível em: <http://search.ebscohost.com>
17. Birth defects: Down syndrome. March of Dimes Foundation Web site. [acessado em 14/07/2016]. Disponível em: [http://www.marchofdimes.com/baby/birthdefects\\_downsyndrome.html](http://www.marchofdimes.com/baby/birthdefects_downsyndrome.html).
18. Chapman RS, Hesketh LJ. Behavioral phenotype of individuals with Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2000;6(2):84-95.

19. Coe DA, Matson JL, Russell DW, Slifer KJ, Capone GT, Baglio C, et al. Behavior problems of children with Down syndrome and life events. *J Autism Dev Disord*. 1999;29(2):149-56.
20. Dykens EM. Psychiatric and behavioral disorders in persons with Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2007;13(3):272-8.
21. Bull MJ, Genetics Co. Health supervision for children with Down syndrome. *Pediatrics*. 2011;128(2):393-406.
22. Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet*. 2004;5(10):725-38.
23. Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Baddour LM, Levison M, et al. Prevention of infective endocarditis: guidelines from the American Heart Association: a guideline from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *J Am Dent Assoc*. 2008;139 Suppl:3S-24S.
24. Pandit C, Fitzgerald DA. Respiratory problems in children with Down syndrome. *J Paediatr Child Health*. 2012;48(3):E147-52.
25. Xu Y, Li W, Liu X, Chen H, Tan K, Chen Y, et al. Identification of dysregulated microRNAs in lymphocytes from children with Down syndrome. *Gene*. 2013;530(2):278-86.
26. Wilson MD. Special considerations ... for the dental professional for patients with Down's syndrome. *J Okla Dent Assoc*. 1994;84(3):24-6.
27. Desai SS. Down syndrome: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997;84(3):279-85.
28. Areias CM, Sampaio-Maia B, Guimaraes H, Melo P, Andrade D. Caries in Portuguese children with Down syndrome. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(7):1183-6.
29. de Moraes ME, de Moraes LC, Dotto GN, Dotto PP, dos Santos LR. Dental anomalies in patients with Down syndrome. *Braz Dent J*. 2007;18(4):346-50.
30. Townsend GC. Dental crown variants in children and young adults with Down syndrome. *Acta Odontol Pediatr*. 1986;7(2):35-9.
31. Seow WK. Clinical diagnosis of enamel defects: pitfalls and practical guidelines. *Int Dent J*. 1997;47(3):173-82.
32. Ondarza A, Jara L, Muñoz P, Blanco R. Sequence of eruption of deciduous dentition in a Chilean sample with Down's syndrome. *Arch Oral Biol*. 1997;42(5):401-6.
33. Jara L, Ondarza A, Blanco R, Valenzuela C. The sequence of eruption of the permanent dentition in a Chilean sample with Down's syndrome. *Arch Oral Biol*. 1993;38(1):85-9.
34. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res*. 2004;38(3):182-91.
35. Featherstone JD. The caries balance: the basis for caries management by risk assessment. *Oral Health Prev Dent*. 2004;2 Suppl 1:259-64.
36. Barnett ML, Press KP, Friedman D, Sonnenberg EM. The prevalence of periodontitis and dental caries in a Down's syndrome population. *J Periodontol*. 1986;57(5):288-93.

37. Stabholz A, Mann J, Sela M, Schurr D, Steinberg D, Shapira J. Caries experience, periodontal treatment needs, salivary pH, and *Streptococcus mutans* counts in a preadolescent Down syndrome population. *Spec Care Dentist*. 1991;11(5):203-8.
38. Vigild M. Dental caries experience among children with Down's syndrome. *J Ment Defic Res*. 1986;30 ( Pt 3):271-6.
39. Morinushi T, Lopatin DE, Tanaka H. The relationship between dental caries in the primary dentition and anti *S. mutans* serum antibodies in children with Down's syndrome. *J Clin Pediatr Dent*. 1995;19(4):279-84.
40. Cogulu D, Sabah E, Kutukculer N, Ozkinay F. Evaluation of the relationship between caries indices and salivary secretory IgA, salivary pH, buffering capacity and flow rate in children with Down's syndrome. *Arch Oral Biol*. 2006;51(1):23-8.
41. Davidovich E, Aframian DJ, Shapira J, Peretz B. A comparison of the sialochemistry, oral pH, and oral health status of Down syndrome children to healthy children. *Int J Paediatr Dent*. 2010;20(4):235-41.
42. Areias C, Sampaio-Maia B, Pereira MeL, Azevedo A, Melo P, Andrade C, et al. Reduced salivary flow and colonization by mutans streptococci in children with Down syndrome. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(9):1007-11.
43. Macho V, Palha M, Macedo AP, Ribeiro O, Andrade C. Comparative study between dental caries prevalence of Down syndrome children and their siblings. *Spec Care Dentist*. 2013;33(1):2-7.
44. Fung K, Allison PJ. A comparison of caries rates in non-institutionalized individuals with and without Down syndrome. *Spec Care Dentist*. 2005;25(6):302-10.
45. Ulseth JO, Hestnes A, Stovner LJ, Storhaug K. Dental caries and periodontitis in persons with Down syndrome. *Spec Care Dentist*. 1991;11(2):71-3.
46. Mathias MF, Simionato MR, Guaré RO. Some factors associated with dental caries in the primary dentition of children with Down syndrome. *Eur J Paediatr Dent*. 2011;12(1):37-42.
47. Oredugba FA. Oral health condition and treatment needs of a group of Nigerian individuals with Down syndrome. *Downs Syndr Res Pract*. 2007;12(1):72-6.
48. Deps TD, Angelo GL, Martins CC, Paiva SM, Pordeus IA, Borges-Oliveira AC. Association between Dental Caries and Down Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(6):e0127484.
49. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986;50(4):353-80.
50. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res*. 2011;45(1):69-86.
51. Schilling KM, Bowen WH. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 1992;60(1):284-95.
52. Loesche WJ, Rowan J, Straffon LH, Loos PJ. Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. *Infect Immun*. 1975;11(6):1252-60.
53. Köhler B, Pettersson BM, Bratthall D. *Streptococcus mutans* in plaque and saliva and the development of caries. *Scand J Dent Res*. 1981;89(1):19-25.

54. Zickert I, Emilson CG, Krasse B. Correlation of level and duration of *Streptococcus mutans* infection with incidence of dental caries. *Infect Immun*. 1983;39(2):982-5.
55. Lang NP, Hotz PR, Gusberti FA, Joss A. Longitudinal clinical and microbiological study on the relationship between infection with *Streptococcus mutans* and the development of caries in humans. *Oral Microbiol Immunol*. 1987;2(1):39-47.
56. Shapira J, Stabholz A, Schurr D, Sela MN, Mann J. Caries levels, *Streptococcus mutans* counts, salivary pH, and periodontal treatment needs of adult Down syndrome patients. *Spec Care Dentist*. 1991;11(6):248-51.
57. de Castilho AR, Pardi V, Pereira CV. Dental caries experience in relation to salivary findings and molecular identification of *S. mutans* and *S. sobrinus* in subjects with Down syndrome. *Odontology*. 2011;99(2):162-7.
58. Linossier AG, Valenzuela CY, Toledo H. Differences of the oral colonization by *Streptococcus* of the mutans group in children and adolescents with Down syndrome, mental retardation and normal controls. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008;13(9):E536-9.
59. Alaluusua S, Mättö J, Grönroos L, Innilä S, Torkko H, Asikainen S, et al. Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. *Arch Oral Biol*. 1996;41(2):167-73.
60. Zhou Q, Qin X, Qin M, Ge L. Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in 3-4-year-old children with severe caries or without caries. *Int J Paediatr Dent*. 2011;21(6):422-31.
61. Kreulen CM, de Soet HJ, Hogeveen R, Veerkamp JS. *Streptococcus mutans* in children using nursing bottles. *ASDC J Dent Child*. 1997;64(2):107-11.
62. Saarela M, Hannula J, Mättö J, Asikainen S, Alaluusua S. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Arch Oral Biol*. 1996;41(8-9):821-6.
63. Li Y, Caufield PW. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. *Oral Microbiol Immunol*. 1998;13(1):17-22.
64. Li Y, Caufield PW, Emanuelsson IR, Thornqvist E. Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. *Oral Microbiol Immunol*. 2001;16(1):16-23.
65. Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushiya M, Koga T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2000;15(4):258-62.
66. Cogulu D, Sabah E, Uzel A, Ozkinay F. Genotyping of *Streptococcus mutans* by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down Syndrome. *Arch Oral Biol*. 2006;51(3):177-82.
67. Barone S, Macedo C, Marin JM. Arbitrarily primed polymerase chain reaction for fingerprinting the genotype identification of mutans streptococci in children with Down syndrome. *Spec Care Dentist*. 2005;25(1):37-42.
68. Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res*. 1993;72(1):37-45.
69. Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, Kuramitsu HK. Role of the *Streptococcus mutans* *gff* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect Immun*. 1993;61(9):3811-7.

70. Napimoga MH, Kamiya RU, Rosa RT, Rosa EA, Höfling JF, Mattos-Graner R, et al. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. *J Med Microbiol.* 2004;53(Pt 7):697-703.
71. Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MP. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J Dent Res.* 2000;79(6):1371-7.
72. Zero DT, Fu J, Anne KM, Cassata S, McCormack SM, Gwinner LM. An improved intra-oral enamel demineralization test model for the study of dental caries. *J Dent Res.* 1992;71 Spec No:871-8.
73. Paddick JS, Brailsford SR, Kidd EA, Gilbert SC, Clark DT, Alam S, et al. Effect of the environment on genotypic diversity of *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus oralis* in the oral biofilm. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(11):6475-80.
74. Redmo Emanuelsson IM, Carlsson P, Hamberg K, Bratthall D. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18(1):24-9.

## ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

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

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

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

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

Local e data: \_\_\_\_\_ Telefones para contato: \_\_\_\_\_

Assinatura do responsável pela criança: \_\_\_\_\_

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

ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE