

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CAROLINA SCHWERTNER

ANÁLISE BIOQUÍMICA DA SALIVA E DO BIOFILME DENTAL  
DE CRIANÇAS COM SÍNDROME DE DOWN

Porto Alegre  
2014

CAROLINA SCHWERTNER

ANÁLISE BIOQUÍMICA DA SALIVA E DO BIOFILME DENTAL  
DE CRIANÇAS COM SÍNDROME DE DOWN

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

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

Porto Alegre  
2014

### CIP - Catalogação na Publicação

Schwertner, Carolina

Análise bioquímica da saliva e biofilme dental de crianças com síndrome de Down / Carolina Schwertner. - 2014.

31 f.

Orientadora: Lina Naomi Hashizume.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Síndrome de Down. 2. Saliva. 3. Biofilme. 4. Eletrólitos. I. Hashizume, Lina Naomi, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Carlos e Roseli, pelo amor incondicional e por não medirem esforços para as minhas realizações.

Ao meu irmão André, pelo exemplo e incentivo.

À professora Lina Naomi Hashizume, pela paciência na orientação e apoio.

Aos amigos e colegas, pelo apoio constante, dividindo angústias e alegrias. Em especial ao Maurício Moreira, Luisa Mercado e Alessandra Dariva que participaram ativamente desta etapa.

## RESUMO

SCHWERTNER, Carolina. **Análise bioquímica da saliva e do biofilme dental de crianças com síndrome de Down.** 2014. 31 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

As composições bioquímicas da saliva e do biofilme dental podem refletir o estado de saúde bucal dos indivíduos num determinado momento. Alterações específicas decorrentes da síndrome de Down (SD) manifestam-se na cavidade bucal podendo ter como consequência alterações nas composições bioquímicas da saliva e do biofilme dental de indivíduos com a SD. Entretanto verifica-se uma escassez na literatura em relação a estudos sobre este tema. O objetivo do presente estudo foi avaliar as composições bioquímicas da saliva e do biofilme dental de crianças com SD residentes na cidade de Porto Alegre, RS. Participaram deste estudo 144 crianças de 6 a 14 anos de idade, sendo 61 crianças com SD e 83 crianças sem SD. Amostras de saliva estimulada e de biofilme dental acumulado por 48 horas foram coletados dos participantes do estudo. As concentrações de flúor (F), cálcio (Ca) e fósforo (P) foram dosadas para as amostras de saliva e biofilme dental. As dosagens de Ca e P foram determinadas colorimetricamente utilizando os reagentes Arsenazo III e molibdato, respectivamente. Para as dosagens das concentrações de F, foi utilizado um eletrodo específico para flúor. Para o biofilme dental além da análise da concentração de F, Ca e P, foram avaliadas as concentrações de polissacarídeos extracelulares (PEC) utilizando-se o reagente ácido sulfúrico. Os resultados obtidos para os grupos com e sem SD foram comparados por meio do teste *U* de Mann-Whitney com nível de significância de 5%. As concentrações salivares de F, Ca e P não apresentaram diferenças entre as crianças com SD e as crianças sem SD. Com relação ao biofilme dental, as crianças com SD apresentaram menores concentrações de P e maiores concentrações de PEC comparadas às das crianças sem SD ( $P < 0,05$ ). Baseado nos resultados do presente estudo conclui-se que o biofilme dental de crianças com SD apresenta maior potencial cariogênico do que o biofilme de crianças sem SD.

Palavras-chave: Síndrome de Down. Saliva. Biofilme. Eletrólitos.

## ABSTRACT

SCHWERTNER, Carolina. **Biochemical analysis of saliva and dental plaque of children with Down syndrome.** 2014. 31 f. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

The biochemical composition of saliva and dental biofilm may reflect the state of oral health of individuals in a certain moment. Down syndrome (DS) manifests specific changes in the oral cavity, thus possibly resulting in changes in the biochemical composition of saliva and dental plaque of individuals with DS. However, there is a lack of studies on this topic in the literature. The aim of this study was to evaluate the biochemical composition of saliva and dental plaque in children with DS living in the city of Porto Alegre, Brazil. The study included 144 children of 6 to 14 years old, being 61 children with DS and 83 without DS. Stimulated saliva samples and accumulated biofilm for 48 hours were collected from study participants. The concentrations of fluoride (F), calcium (Ca) and phosphorus (P) were measured in the samples of saliva and dental biofilm. The levels of Ca and P were determined colorimetrically using the reagents Arsenazo III and molybdate, respectively. The concentrations of F, were measured with a specific fluoride electrode. In the biofilm, besides the concentration of F, Ca and P, extracellular polysaccharides (PEC) were measured using the sulfuric acid reactant. The results for the groups with and without DS were compared using the Mann-Whitney test with a significance level of 5%. The salivary concentrations of F, Ca and P did not differ between children with DS and children without DS. Regarding the biofilm, children with DS showed lower P and higher concentrations of PEC compared to children without (P <0.05). Based on the results of this study, we concluded that the biofilm of children with DS presents greater cariogenic potential than children without DS.

Keywords: Down syndrome. Saliva. Dental Plaque. Electrolytes.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITURATURA.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	12
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
4.1	LOCAL DE ORIGEM E REALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	13
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	13
4.3	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	13
4.4	EXAME CLÍNICO.....	13
4.5	COLETA DE SALIVA.....	13
4.6	COLETA DE BIOFILME DENTAL.....	14
4.7	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO BIOFILME.....	14
4.8	ANÁLISES BIOQUÍMICAS DA SALIVA (F, Ca, e P).....	14
4.9	ANÁLISES BIOQUÍMICAS DO BIOFILME DENTAL (F, Ca, P e PEC).....	16
4.10	PROCESSAMENTO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
4.11	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	19
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>27</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>28</b>
	ANEXO – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	31

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A síndrome de Down é uma alteração genética prevalente e que acomete os seres humanos em todas as raças e níveis socioeconômicos. John Langdon Down, em 1866, foi o primeiro pesquisador a publicar um ensaio descrevendo o fenótipo de crianças com características comuns diferentes de outras crianças com retardo mental, e classificou essas características como distintas e separadas (DOWN, 1866). Somente em 1959, que pesquisadores franceses (LEJEUNE; GAUTIER; TURPIN, 1959), e americanos (JACOBS et al., 1959) – de forma independente – realizaram descobertas de cariotipagem e definiram o exato número de cromossomos no genoma humano, percebendo que a Síndrome de Down era causada por um cromossomo extra presente no vigésimo primeiro par. Em vez de 46 cromossomos, nesses indivíduos encontram-se 47.

A incidência da síndrome de Down é de 1 para cada 700 a 1000 nascimentos. Estima-se que no Brasil haja em torno de 300 mil pessoas com a síndrome.

Não se sabe ainda a causa para a não disjunção cromossômica. Atualmente estudos mostram que o aumento da idade materna aumenta a frequência desta alteração, aos 35 anos de idade, sua prevalência chega a 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 (SOCIETY NDS, 2013).

A respeito das características físicas mais comuns dos indivíduos com Síndrome de Down, destacam-se a braquicefalia, boca e orelhas pequenas, hipotonia muscular, fissuras palpebrais oblíquas, excesso de pele na nuca e pescoço, prega palmar única transversa e um quinto dedo curto com clinodactilia e, frequentemente, um sulco profundo entre o primeiro e o segundo dedo (ANTONARAKIS et al., 2004)

A dificuldade cognitiva também varia bastante entre os indivíduos com Síndrome de Down, sendo classificada como leve, moderada ou ocasionalmente grave, dependendo de seu QI. Existe um significativo risco de perda de audição (75%), apneia obstrutiva do sono (50-79%), cardiopatias congênitas (50%), disfunção neurológica (1-13%), atresia gastrointestinal (13%), luxação do quadril (6%), doenças da tireoide (13-18%) e leucemia (1%) (BULL; COMMITTEE ON GENETICS, 2011).

Dentre as alterações estomatognáticas comuns em indivíduos com a síndrome, podemos citar palato ogival, magroglossia e hipertrofia papilar. (FISCHER-BRANDIES; SCHMID; FISCHER-BRANDIES, 1986). Estes indivíduos também apresentam mais hipoplasia do terço médio da face com reduzida protusão nasal e um menor terço inferior da



face quando comparados com indivíduos não-sindrômicos (DE MORAES et al., 2007). A má-oclusão (principalmente mordida aberta anterior e mordida cruzada posterior), bruxismo e respiração bucal são achados frequentes nesta população. (DAVIDOVICH et al., 2010).

Indivíduos com síndrome de Down apresentam anomalias dentárias com bastante frequência. A alteração dental mais comum nestes indivíduos diz respeito à variação no número e na morfologia dos dentes. Entre as alterações, citam-se a anadontia, erupção dentária tardia e com cronologia diferenciada, alta incidência de dentes impactados, hipodontia e o taurodontismo (SEAGRIFF-CURTIN; PUGLIESE; ROMER, 2006; DE MORAES et al., 2007).

Trabalhos publicados têm mostrado que pessoas com síndrome de Down apresentam menores índices de dentes cariados do que pessoas não-sindrômicas (BARNETT et al., 1986); STABHOLZ et al., 1991; COGULO et al., 2006; DAVIDOVICH et al., 2010; AREIAS et al., 2012). No entanto, outros estudos não mostram esta diferença no índice de dentes cariados (ULSETH et al., 1991; FUNG; ALLISON, 2005; OREDUGBA, 2007; MATHIAS et al., 2011; MOREIRA et al., 2013). Em indivíduos com síndrome de Down, essas diferenças podem estar relacionadas com características específicas relacionadas à síndrome, com manifestações orais. Algumas características podem ser causadas tanto por fatores ambientais, como por oligodontias congênitas, atraso na erupção dentária, bem como alterações na composição salivar (AREIAS et al., 2012).

A análise da composição bioquímica tanto da saliva quanto do biofilme pode levar ao conhecimento do ambiente bucal e suas interações com os tecidos mineralizados dos dentes (SIQUEIRA et al., 2004; DAVIDOVICH et al., 2010).

A saliva é uma secreção exócrina, composta 99% por água, e que contém uma ampla variedade de eletrólitos e proteínas. Entre os eletrólitos destacam-se: sódio, potássio, cálcio, cloro, magnésio, bicarbonato, fósforo. Entre as principais funções salivares destacam-se limpeza, proteção, manutenção do pH bucal e integridade dos tecidos moles e duros da cavidade bucal. A capacidade de tamponamento salivar mantém o pH bucal em 6,8. Alterações nesse valor são prontamente neutralizadas pelos sistemas de tamponamento salivar (EPSTEIN JB; SCULLY C, 1992).

A saliva pode auxiliar na avaliação do risco de desenvolvimento de cárie e também no diagnóstico de outras doenças utilizando métodos sialométricos e sialoquímicos. Determinadas substâncias podem ser dosadas e assim contribuir para o diagnóstico de doenças a partir do exame de níveis de elementos inorgânicos e orgânicos salivares. (KÖHLER et al., 1981). Há muitos estudos envolvendo fluxo e capacidade tampão salivar de

crianças com síndrome de Down, porém, poucos estudos abordam concentrações de íons inorgânicos na saliva (SIQUEIRA; NICOLAU, 2002; SIQUEIRA et al., 2006, AREIAS et al. 2012). Em estudo de Cogulo et al (2006), cuja amostra era composta por 75 crianças de 7 a 12 anos com SD comparadas a crianças da mesma faixa etária sem a síndrome, não foram encontradas diferenças significantes entre pH salivar, capacidade tampão e fluxo salivar comparando os grupos. Já em estudo recente de Areias et al. (2012), foi encontrado menor fluxo salivar em crianças e adolescentes (6 a 18 anos) com SD quando comparados a seus irmãos sem síndrome. Os autores não encontraram diferença na quantidade de IgA e no pH salivar.

Estudos sugerem que a síndrome de Down pode alterar a concentração dos eletrólitos da saliva. Davidovich et al. (2010), encontrou maiores concentrações de cálcio e cloreto na saliva de crianças com síndrome de Down que apresentavam dentes cariados, comparado com o grupo de crianças sem a síndrome também com cáries. Com relação aos íons sódio e potássio, a concentração foi significativamente maior no grupo com a síndrome e com presença de cáries, comparado com o grupo sem a síndrome e sem cáries.

Outro estudo também com crianças que apresentavam a síndrome de Down e grupo sem síndrome, não encontrou diferenças significativas na concentração de cálcio, fósforo e magnésio entre os grupos. Já a concentração de sódio encontrada, foi significativamente maior no grupo com síndrome de Down (SIQUEIRA et al., 2007).

Em contrapartida, um estudo recente não encontrou diferenças na composição iônica da saliva. As concentrações de cálcio, fósforo, potássio e cloreto não apresentaram diferenças significativas quando se comparou um grupo de crianças com síndrome de Down e um grupo de crianças sem a síndrome. (AREIAS et al., 2013).

Portanto, na literatura, existem tanto estudos que encontraram diferenças no número de eletrólitos da saliva de indivíduos com síndrome de Down, como os que não encontraram diferenças, não havendo um consenso.

Assim como a saliva, o biofilme dental também apresenta níveis de eletrólitos que podem ser quantificados e relacionados com cárie. (CURY et al., 1997; CURY et al., 2000). Não há estudos que analisem a presença de íons no biofilme dental em pessoas que apresentam síndrome de Down.

Os polissacarídeos extracelulares (PEC) produzidos pelas bactérias formadoras do biofilme dental são um modo de armazenamento quando há presença de grandes quantidades de carboidratos, e são formados essencialmente a partir de sacarose. Os PEC são sintetizados principalmente por bactérias a partir do carboidrato sacarose sendo importantes na adesão

microbiana. Eles contribuem para o aumento da espessura e da porosidade do biofilme dental, aumentando a concentração de ácido na interface dente-biofilme. Há uma correlação positiva entre dieta rica em sacarose e aumento da produção de PEC no biofilme, sendo que bactérias capazes de produzir maior quantidade de polissacarídeos extracelulares tendem a ser mais cariogênicas (NISENGARD; NEWMAN, 1994).

Estudos sugerem que a composição do biofilme dental pode influenciar na sua cariogenicidade, e que o seu padrão de polissacarídeo insolúvel e baixa concentração de cálcio, fósforo e flúor também devem ser considerados (CURY et al., 1997 e CURY et al., 2000).

## 2 JUSTIFICATIVA

Estudos têm relatado diferenças nas concentrações de íons na saliva de pacientes com síndrome de Down, mas não há um consenso se a síndrome pode se manifestar nas concentrações de eletrólitos na saliva desses indivíduos, influenciando tanto no padrão de cárie quanto no ambiente bucal em sua totalidade.

Não foram encontrados na literatura estudos que avaliassem a composição bioquímica do biofilme dental de indivíduos com síndrome de Down comparando-os com os de indivíduos sem esta síndrome, o que torna este um importante campo para estudo, pois as concentrações dos eletrólitos e PEC podem interferir diretamente na integridade dos tecidos mineralizados dentários.

Portanto, é importante a avaliação da concentração de eletrólitos tanto na saliva quanto no biofilme dental de crianças com SD através de um estudo bem delineado e controlado.

### **3 OBJETIVOS**

Os objetivos foram divididos em objetivos gerais e objetivos específicos.

#### **3.1 OBJETIVOS GERAIS**

O objetivo do estudo foi avaliar a composição bioquímica da saliva e do biofilme dental de crianças com SD, comparando-as com crianças sem a síndrome, residentes na cidade de Porto Alegre, RS.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar e comparar as concentrações de flúor, cálcio, fósforo na saliva de crianças com síndrome de Down e crianças sem a síndrome;
- Analisar e comparar as concentrações de flúor, cálcio, fósforo e polissacarídeos extracelulares no biofilme dental entre os dois grupos estudados.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DE ORIGEM E REALIZAÇÃO DA PESQUISA

O estudo foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre, RS.

### 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este é um estudo laboratorial, cego e controlado.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

A amostra do presente estudo foi selecionada a partir de um levantamento realizado em um estudo anterior cujo objetivo era verificar as condições de saúde bucal e níveis salivares de *Streptococcus mutans* em crianças com síndrome de Down, comparando-as com crianças não-sindrômicas (MOREIRA et al., 2013).

A amostra incluiu 144 crianças com idade entre 6 e 14 anos. O grupo teste foi composto por 61 crianças com confirmação citogenética de síndrome de Down que estavam cadastradas no serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil. O grupo controle foi composto de 83 crianças sem a síndrome selecionadas entre os alunos de uma escola pública em Porto Alegre. Nenhuma das crianças, em ambos os grupos, apresentavam alguma doença sistêmica ou haviam utilizado antibióticos por pelo menos três meses antes do estudo. Os critérios de exclusão foram: impossibilidade de se realizar exame clínico (devido à falta de cooperação da criança) e uso de aparelho ortodôntico.

Informações referentes a consumo diário de açúcar foram obtidas através de entrevistas por telefone com os pais ou responsáveis das crianças.

### 4.4 EXAME CLÍNICO

O exame clínico foi realizado por um único examinador bem treinado enquanto os indivíduos estavam sentados em uma cadeira. Antes do estudo foram realizadas sessões de calibração, onde vinte crianças foram examinadas duas vezes com um intervalo de uma semana.

A concordância intra-examinador para exame clínico foi de 0,96, que é considerado excelente de acordo com uma interpretação padrão de kappa. Anteriormente ao diagnóstico

de cárie, o biofilme dental foi removido profissionalmente. O exame clínico foi baseado em critérios visuais-táteis com a utilização de um espelho dental e uma sonda dental sem corte, assistida pela luz artificial. O diagnóstico de cárie ocorreu com base na detecção de lesões de cárie na fase de cavitação, de acordo com os critérios recomendados por WHO.

#### 4.5 COLETA DE SALIVA

Cada participante recebeu um pedaço de goma de mascar sem açúcar para que ocorresse a estimulação salivar. A goma foi mastigada por 30 segundos e a saliva produzida durante este período, descartada. Os voluntários permaneciam mastigando a goma por 5 minutos e a saliva era coletada em um frasco coletor estéril. As amostras de saliva foram armazenadas em microtubos estéreis, e transportada sob refrigeração até o Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul onde foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até posteriores análises laboratoriais.

As crianças que não puderam ter a sua saliva estimulada coletada devido ao nível de deficiência causada pela síndrome de Down, dificuldade de mastigação ou de expectoração tiveram a saliva não estimulada coletada.

#### 4.6 COLETA DE BIOFILME DENTAL

Foi solicitado que cada voluntário não higienizasse seus dentes por 48 horas antes do horário da coleta de biofilme, que foi realizada em uma segunda consulta.

O biofilme dental supragengival foi coletado de todos os dentes, utilizando-se curetas estéreis (NOBRE DOS SANTOS et al., 2002), armazenado em microtubo estéril, e transportado sob refrigeração até o Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul onde foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até posteriores análises laboratoriais.

Após a coleta de biofilme os voluntários tinham seus dentes higienizados e era realizada uma orientação de higiene bucal para os participantes juntamente com os responsáveis.

#### 4.7 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO BIOFILME

As amostras de biofilme foram sonicadas em solução salina, e posteriormente, foi realizada a diluição seriada. Alíquotas de 25 ul de cada diluição foram colocadas em duplicata em mitis salivarius bacitracina agar (Difco, Becton Dickinson and Company, MD, EUA) para a quantificação de *streptococos mutans*. As placas foram incubadas microaerofilia a  $37^{\circ}\text{C}$

durante 48 h. A identificação dos *estreptococos mutans* foi realizada com base na morfologia da colônia. As contagens microbiológicas foram expressas em unidades formadoras de colônias por mililitro de saliva (UFC / mL). Todas as contagens foram realizadas de forma cega pelo mesmo pesquisador.

#### 4.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS DA SALIVA

As amostras de saliva foram centrifugadas a 4000 rpm, durante 5 minutos a 25°C. O sobrenadante era armazenado a – 20°C.

O descongelamento se deu em temperatura ambiente, anteriormente às análises. Após, a saliva era dividida entre as análises de concentração de flúor, cálcio e fósforo salivar.

##### Análise de flúor salivar

A análise da concentração de flúor foi realizada por meio de um eletrodo específico (Orion 9609, São Paulo, Brasil) conectado a um analisador de íons (modelo RS232, PROCYON, São Paulo, Brasil) (CURY et al., 1997).

Uma curva de calibração foi preparada, contendo os seguintes padrões de flúor: 0,02ppmF, 0,04ppmF, 0,08ppmF, 0,1ppmF, 0,2ppmF, 0,3ppmF e 0,4ppmF. Em cada padrão foram adicionados HCl 1M e Total Ionic Strength Adjustment Buffer III Solution (TISAB III) com NaOH. Com ajuda do eletrodo específico, foi analisada inicialmente a curva de calibração, realizada em duplicata. Após a curva, foi medida a concentração do flúor nas amostras de saliva. Em cada amostra era adicionado também HCl 1M e TISAB III.

##### Análise de cálcio salivar

A análise do cálcio foi quantificada por método colorimétrico. Foi utilizado como reagente o Arsenazo III para a detecção de cálcio nas amostras, e as leituras foram realizadas utilizando um espectrofotômetro (modelo Biowate 3, THERMO SCIENTIFIC, Madison, USA) (VOGEL; CHOW; BROWN, 1983; VOGEL et al., 1990). Uma curva de calibração foi realizada em duplicata, tendo como base um padrão de cálcio 400uM, água deionizada e Arsenazo III. A leitura foi realizada no espectrofotômetro com comprimento de onda de 650 nm. Primeiramente deu-se a leitura da curva duplicada, logo após, realizou-se a leitura das amostras que foram acrescidas de Arsenazo III.



#### Análise de fósforo salivar

A análise de fósforo se deu por método direto com fosfomolibdato. Em solução sulfúrica, os íons fósforo formam com o molibdato um complexo denominado fosfomolibdato de amônia. A concentração deste complexo formado é proporcional à concentração de fósforo (VOGEL; CHOW; BROWN, 1983; VOGEL et al., 1990). A curva de calibração, realizada em duplicata, foi composta de água deionizada, padrão de fósforo 3mg%, ácido molibidico e reativo redutor. Para cada amostra, juntamente com a saliva foi adicionado ácido molibídico e reativo redutor, ambos preparados anteriormente às análises. Após a adição do ácido molibidico em capela específica, tanto nos padrões como nas amostras, era necessário agitar e esperar 10 minutos. Após, adicionava-se o reativo redutor, do qual, transcorridos 20 minutos foi realizada a leitura primeiramente das curvas e posterior das amostras em um espectrofotômetro (660nm) (modelo Biowate 3, THERMO SCIENTIFIC, Madison, USA).

#### 4.9 ANÁLISES BIOQUÍMICAS DO BIOFILME DENTAL

As amostras de biofilme dental foram secas utilizando-se uma câmara a vácuo (KARTELL, ITÁLIA) com pentóxido de fósforo por 24 horas (PEARCE et al., 1984). Após a dessecação, as amostras foram transferidas de microtubo e o seu peso seco foi obtido utilizando uma balança analítica (SARTORIUS AG, GOETTINGEN, ALEMANHA). Para a realização da extração dos componentes a serem analisados no biofilme, foi adicionado uma solução de HCl 0,5M na proporção de 0,1mL para cada 1mg de biofilme seco. As amostras com HCl 0,5M foram colocadas sob agitação constante por 3 horas. Ao final destas três horas, foi acrescentado TISAB II pH 5 (contendo 20 gramas de NaOH/L) na proporção de 0,1 mL de TISAB II para cada 1mg de biofilme seco. As amostras foram agitadas e centrifugadas por 5 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para outro microtubo e congelado para posterior análise de flúor, cálcio e fósforo. O precipitado restante foi lavado em solução salina 0,89% e em seguida foi adicionado o reagente NaOH 1M (0,2 mL) para cada 1 mg de biofilme seco. As amostras foram mantidas sob agitação constante por 3 horas. As amostras foram então centrifugadas e o sobrenadante foi transferido de microtubo e congelado para posterior análise de polissacarídeos extracelulares insolúveis.

#### Análise de flúor do biofilme dental

A análise da concentração de flúor no biofilme foi realizada por meio de eletrodo específico (ORION 9609, São Paulo, Brasil) conectado a um analisador de íons (Modelo RS232, PROCYON, São Paulo, Brasil) como na análise salivar (CURY, 1997).

Diferente da análise do flúor salivar, a curva de calibração, continha os seguintes padrões de flúor: 0,1ppmF, 0,2ppmF, 0,4ppmF, 0,8ppmF, 1,6ppmF, 2ppmF, 4,0ppmF, 8ppmF e 16ppmF. Em cada padrão foram adicionados HCl 1M e TISAB II com NaOH. Com ajuda de eletrodo específico, foi analisada inicialmente a curva de calibração, realizada em duplicata. Após a curva, foi medida a concentração do flúor nas amostras de biofilme que eram colocadas diretamente em contato com eletrodo para leitura.

#### Análise de cálcio do biofilme dental

A análise do cálcio foi quantificada por método colorimétrico, igualmente às amostras salivares. Foi utilizado como reagente o Arsenazo III para a detecção de cálcio nas amostras de biofilme, e as leituras foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro (VOGEL; CHOW; BROWN, 1983; VOGEL et al., 1990). Uma curva de calibração foi realizada em duplicata, tendo como base um padrão de cálcio 400uM, água deionizada e Arsenazo III. A leitura foi realizada no espectrofotômetro (650nm). Primeiramente deu-se a leitura da curva duplicada, logo após, realizou-se a leitura das amostras de biofilme que foram acrescidas de Arsenazo III.

#### Análise de fósforo do biofilme dental

A análise de fósforo se deu por método direto com fosfomolibdato, com protocolo igual ao da análise salivar. Em solução sulfúrica, os íons fósforo formam com o molibdato um complexo denominado fosfomolibdato de amônia. A concentração deste complexo formado é proporcional à concentração de fósforo inorgânico (FISKE; SUBARROW, 1925). A curva de calibração, realizada em duplicata, foi composta de água deionizada, padrão de fósforo 3 mg%, ácido molibídico e reativo redutor. Para cada amostra, juntamente com o biofilme foi adicionado ácido molibídico e reativo redutor, ambos preparados anteriormente às análises. Após a adição do ácido molibídico em capela específica, tanto nos padrões como nas amostras, era necessário agitar e esperar 10 minutos. Após, adicionava-se o reativo redutor, do qual, transcorridos 20 minutos foi realizada a leitura primeiramente das curvas e posterior das amostras em um espectrofotômetro (660nm).

#### Análise de polissacarídeo extracelular (PEC) do biofilme dental

As dosagens de polissacarídeos insolúveis foram determinadas colorimetricamente utilizando-se um espectrofotômetro (DUBOIS et al., 1956). Para a curva de calibração foi utilizado como padrão a Glucose 100 ul/mL. Utilizaram-se os reagentes fenol 5% e ácido

sulfúrico 95% tanto na curva de calibração quanto nas amostras. Transcorridos 20 minutos da adição dos reagentes foi feita a leitura em espectrofotômetro (490nm).

#### 4.10 PROCESSAMENTO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi testada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Os dados que tiveram distribuição normal foram comparados utilizando-se o teste *t* de Student com o objetivo de comparar os grupos de crianças com e sem a síndrome de Down. Os resultados destas variáveis foram expressos como valores de médias e desvio-padrão. Uma vez que não houve normalidade em quase todas as variáveis, optou-se pela aplicação do teste *U* de Mann-Whitney. Os resultados foram expressos como mediana e percentis 25 e 75%. O nível de significância foi de 5%. Todas as variáveis foram analisadas com auxílio do *software* SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 18.0 for Windows (IBM, Chicago, EUA).

#### 4.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Todos os pais ou responsáveis foram previamente informados dos objetivos deste estudo e assinaram um termo de comprometimento livre e esclarecido autorizando o exame clínico e a coleta de saliva e biofilme dental (ANEXO).

## 5 RESULTADOS

A tabela 1 mostra a caracterização dos participantes do estudo. Para as variáveis gênero, idade, frequência de ingestão de sacarose, contagens de *Streptococcus mutans* no biofilme dental e experiência de cárie, não foram observadas diferenças entre as crianças.

A tabela 2 apresenta as concentrações de flúor, cálcio e fósforo presentes na saliva das crianças com e sem SD. Com relação à saliva, este estudo não encontrou diferenças significativas nas concentrações dos íons flúor, cálcio e fósforo comparando as crianças com SD e as crianças sem a síndrome ( $P > 0,05$ ).

A tabela 3 mostra as concentrações de flúor, cálcio, fósforo e PEC no biofilme dental para as crianças com SD e para as crianças sem a síndrome. Não foram encontradas diferenças significativas na concentração de flúor e cálcio comparando os dois grupos ( $P > 0,05$ ). Entretanto para a concentração de fósforo no biofilme dental foram observados valores significativamente menores no grupo de crianças com SD ( $P = 0,001$ ). Já para as concentrações de polissacarídeos extracelulares foram observados valores significativamente maiores no grupo de crianças com SD comparando os dois grupos ( $P = 0,005$ ).

Tabela 1 - Caracterização dos participantes do estudo

Variáveis analisadas	Crianças com SD (n=61)	Crianças sem SD (n=83)	Valor de P
<b>Gênero</b>			
Homens (%)	57,4%	54,2%	0,836*
Mulheres (%)	42,6%	45,8%	
Idade méd (±DP)	9 (2,06)	9,43 (1,84)	0,201**
Frequência de sacarose md (25-75%)	3 (2-5)	3 (1,5-4)	0,124***
Contagem de <i>Streptococcus mutans</i> (UFC) md	1,6x10 <sup>5</sup>	6,13x10 <sup>4</sup>	0,552***
<b>Experiência de cárie</b>			
Sim (%)	42,6	47,0	0,726*
Não (%)	57,4	53,0	

Méd: média; DP: desvio padrão; Md: mediana; 25-75%: percentis; %: porcentagens; \*Teste do Qui-quadrado \*\* Teste t de Student \*\*\* Teste U de Mann-Whitney.

Tabela 2 - Valores de mediana e percentis (25 e 75%) das concentrações de flúor, cálcio e fósforo na saliva de crianças com SD e crianças sem SD.

Eletrólitos	Crianças com SD (n=61)	Crianças sem SD (n=83)	Valor de $P^*$
Flúor (ppm F)	0,01 (0,01 - 0,02)	0,02 (0,01 - 0,02)	0,273
Cálcio (mM Ca/mL)	32,54 (30,46 - 32,72)	29,31 (24,58 - 33,96)	0,246
Fósforo (mg P/mL)	0,29 (0,20 - 0,37)	0,27 (0,20 - 0,33)	0,638

\*Teste  $U$  de Mann-Whitney,  $P < 0,05$ .

Tabela 3 - Valores de mediana e percentis (25 e 75%) para as concentrações de flúor, cálcio, fósforo e de PEC no biofilme dental de crianças com SD e crianças sem SD.

Eletrólitos	Crianças com SD (n=61)	Crianças sem SD (n=83)	Valor de $P^*$
Flúor (mg F/g)	37,92 (20,88 - 80,44)	39,7 (23,06 - 108,76)	0,257
Cálcio ( $\mu$ M Ca/mg)	194,05 (69,38 - 379,77)	171,17 (90,65 - 388,95)	0,795
Fósforo ( $\mu$ g P/mg)	6,01 (3,9 - 7,83)	7,95 (6,34 - 11,96)	0,001
PEC ( $\mu$ g PEC/mg)	141,93 (102,15 - 179,88)	108,66 (87,42 - 135,33)	0,005

\*Teste  $U$  de Mann-Whitney,  $P < 0,05$ .

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo analisar a composição bioquímica da saliva e do biofilme dental com relação às concentrações de flúor, cálcio, fósforo e PEC em crianças com SD, comparando com as de crianças sem a síndrome.

Com relação aos eletrólitos salivares, este estudo não encontrou diferenças significativas entre as concentrações de flúor, cálcio e fósforo comparando crianças com síndrome de Down e crianças sem a síndrome. Estes resultados concordam com os resultados do estudo realizado por Areias et al. (2013) que analisou as concentrações salivares de cálcio, fósforo, potássio e cloro de 45 pares de irmãos com idades entre 6 e 18 anos, onde um deles apresentava SD e o outro não. Os autores não encontraram diferenças nas concentrações dos eletrólitos avaliados quando comparou crianças com síndrome de Down e crianças sem a síndrome.

Os resultados do presente estudo também concordam com os resultados do estudo de Siqueira et al. (2004) cuja amostra era de 22 crianças com SD e 21 crianças sem SD, com idades variando de 6 a 10 anos. Esse estudo avaliou as concentrações salivares de cálcio, fósforo, zinco e magnésio e não observou diferenças nos valores encontrados entre crianças com síndrome de Down e crianças sem a síndrome.

Outro estudo que apresentou resultados que concordam com os do presente estudo foi o de Siqueira et al. (2007). O autor apresenta uma amostra de bebês com idades entre 2 e 60 meses, contendo 25 crianças com SD e 21 sem SD, e analisou as concentrações salivares de cálcio, fósforo, magnésio e sódio. Nesse estudo os autores também não encontraram diferenças nas concentrações salivares dos eletrólitos cálcio, fósforo, e magnésio comparando os dois grupos. Foi encontrada diferença apenas nas concentrações de sódio salivar, que foi maior nas crianças com SD do que nas crianças sem SD.

Davidovich et al. (2010) em um estudo cuja amostra era de 70 crianças com SD entre 1 e 9 anos, e 32 indivíduos sem SD com idades entre 5 e 15 anos, analisou as concentrações salivares de cálcio, cloro e potássio. Os autores encontraram maiores concentrações de cálcio, cloro e potássio na saliva de crianças com SD e com experiência de cárie. Neste estudo, houve a divisão da amostra em quatro grupos, considerando a experiência de cárie ou não no grupo de estudo e grupo controle, diferente do presente estudo. Por esta razão uma comparação entre os resultados não se torna possível.

Muitos estudos que verificaram as concentrações de eletrólitos na saliva de pessoas com SD apresentam pequeno tamanho amostral (SIQUEIRA et al., 2004; SIQUEIRA et al.,



2007; AREIAS et al., 2013) ou inapropriado grupo de comparação (DAVIDOVICH et al., 2010). Isto pode ser devido à dificuldade de se conseguir participantes para o estudo e o manejo especializado de pacientes com SD (pacientes especiais).

Uma das limitações do presente estudo foi o não controle da exposição de flúor pelos participantes, que podem ocorrer por consumo de água fluoretada, dentifrício fluoretado, também com bochechos fluoretados entre outros. Isto poderia justificar a falta de diferença nas concentrações de flúor da saliva e do biofilme dental encontrado entre os dois grupos.

Outro ponto a ser destacado foi a grande variabilidade inter-individual encontrada nos valores das concentrações dos íons analisados nas leituras tanto da saliva quanto do biofilme dental, o que já foi observado por outros autores (CURY et al., 1997; CURY et al., 2000).

Nenhum estudo até o presente momento havia analisado a composição bioquímica do biofilme dental de indivíduos com SD. As concentrações orgânicas e inorgânicas do biofilme dental são grandes influenciadoras no processo da formação da lesão cariosa, interagindo diretamente com o esmalte dental e devem ser consideradas (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

O presente estudo indicou que crianças com SD apresentam diferenças em relação à quantidade de PEC em seu biofilme dental. As concentrações de PEC no biofilme das crianças com SD se apresentaram maiores do que nas crianças sem SD.

Os PEC são sintetizados principalmente por bactérias a partir do carboidrato sacarose sendo importantes na adesão microbiana. Eles contribuem para o aumento da espessura e da porosidade do biofilme dental, aumentando a concentração de ácido na interface dente-biofilme. Sendo assim bactérias capazes de produzir maior quantidade de polissacarídeos extracelulares tendem a ser mais cariogênicas (NISENGARD; NEWMAN, 1994).

Apesar da contagem de *Streptococcus mutans* do biofilme dental e da frequência diária de sacarose de crianças com SD e de crianças sem SD serem similares ( $p < 0,05$ ), a concentração de PEC no biofilme dental das crianças com SD foi maior do que as crianças sem SD. Estudo de Mattos-Granner et al. (2000) mostrou que mais importante do que o número de micro-organismos cariogênicos presentes no biofilme dental, é a capacidade que eles possuem em sintetizar os PEC. Portanto, sugere-se que os micro-organismos presentes no biofilme de crianças com SD sejam mais cariogênicos do que aqueles presentes no biofilme de crianças sem SD. Estudos avaliando a virulência destes micro-organismos e a sua diversidade genotípica dentro do biofilme dental de crianças com SD podem ajudar a esclarecer este achado.

As crianças com SD apresentaram menores concentrações de fósforo em seu biofilme dental do que as crianças sem SD, o que indica uma mudança na matriz de seu biofilme dental. Os componentes inorgânicos do biofilme contribuem com aproximadamente 5% a 10% do seu peso seco e compreendendo principalmente os íons cálcio, fósforo e flúor.

O processo de desmineralização dental está condicionado à existência de um estado de subsaturação do meio, sendo que o pH e a concentração de íons, dentre eles o fósforo, influenciam na determinação do grau de saturação (PEARSE, 1998). Físico-quimicamente a queda do pH acarreta um desequilíbrio no estado de saturação do fluido do biofilme em relação ao mineral do dente e este tende a se dissolver (FEJERSKOV, KIDD; 2005).

Cury et al. (1997, 2000 e 2004), em estudos envolvendo a composição inorgânica do biofilme dental, verificou que em biofilmes cariogênicos, as concentrações de flúor, cálcio e fósforo são menores do que em biofilmes não cariogênicos. O autor ressalta que a cariogenicidade do biofilme dental não pode ser atribuída apenas a sua maior porosidade, mas também a sua menor composição inorgânica.

Como resultados do presente estudo, as crianças com SD apresentaram um biofilme dental com menor concentração de fósforo e PEC, portanto com maior potencial cariogênico. Entretanto estes dados devem ser avaliados com cautela quando se pretende associar o potencial cariogênico do biofilme dental e a prevalência de cárie em crianças com SD. O presente estudo utilizou amostras de um biofilme dental propositalmente acumulado, pois os responsáveis eram instruídos a não realizar a higiene oral da criança nas 48 horas anteriores à coleta de biofilme. Sendo que esta condição não reflete ao acúmulo de biofilme real apresentado pelo indivíduo em seu cotidiano.

Apesar do biofilme dental de crianças com SD apresentar um maior potencial cariogênico, isto não se refletiu na experiência de cárie apresentada pelas crianças com SD que foi similar à de crianças sem a SD. Dados reportados por Moreira (2013) mostraram que as crianças com SD recebem maior supervisão na escovação diária realizada pelos pais ou responsáveis comparada àquelas sem a SD. Pode-se entender que mesmo possuindo um biofilme dental com potencial cariogênico, um controle efetivo deste biofilme dental teria mais relevância na prevalência de cárie destas crianças.

## 7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados do presente estudo pode-se concluir que:

- Crianças com SD apresentam concentrações salivares de flúor, cálcio e fósforo similares às de crianças sem SD.

- Com relação ao biofilme dental, crianças com SD apresentam um biofilme potencialmente cariogênico, com maiores concentrações de PEC e menores concentrações de fósforo do que as crianças sem SD.

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente estudo mostrou que as crianças com SD apresentam um biofilme dental com maior potencial cariogênico. Estas características, somadas a fatores como dieta cariogênica e um controle deficitário do biofilme dental podem ter conseqüências negativas em relação ao desenvolvimento da cárie dentária.

Sendo a cárie dentária uma doença de caráter multifatorial, ressalta-se a importância do cuidado em escovação e da atenção especial que deve ser considerada para este grupo populacional. A supervisão de um responsável nesses casos se torna de grande relevância para a saúde bucal dessas crianças podendo ser decisivo para o padrão de cárie apresentado por elas.

## REFERÊNCIAS

- ANTONARAKIS, S.E. et al. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. **Nat. Rev. Genet.** London, v. 5, no.10, p. 725-738, Oct. 2004.
- AREIAS, C.M. et al. Caries in Portuguese children with Down syndrome. **Clinics**, São Paulo, v. 66, no. 7, p. 1183-1186, 2011.
- AREIAS, C. M. et al. Reduced salivary flow and colonization by mutans streptococci in children with Down syndrome. **Clinics**, São Paulo, v.67, no.9, p.1007-1011, 2012.
- AREIAS, C. M. et al. Does the chemistry in the saliva of Down syndrome children explain their low caries prevalence? **Eur. J. Paediatr. Dent.** Milano, v 14, no.1, p. 23-26, Mar. 2013.
- BULL, M.J.; COMMITTEE ON GENETICS. Health supervision for children with Down syndrome. **Pediatrics**, Springfield, v.128, no. 2, p. 393-406, Aug. 2011.
- COGULU, D. et al.; 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.**, New York, v.51, n.1, p. 23-28, Jan., 2006.
- CURY, J.A. et al. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Res.** v. 31, p. 356–360. 1997.
- CURY, J.A. et al. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res.** v. 34, p. 491–497, June. 2000.
- CURY, J.A. et al. Composition of dental plaque formed in the presence of sucrose and after its interruption. **Braz. Dent. J.** Ribeirão Preto, v. 14, no. 3, p. 147-152. Mar., 2003. Epub 2004.
- DAVIDOVICH, E. et al. A comparison of the sialochemistry, oral pH, and oral health status of down syndrome children to healthy children. **Int. J. Paediatr. Dent.**, Oxford, v. 20, no. 4, p. 235–241, July. 2010.
- DE MORAES, M.E. et al. Dental Anomalies in Patients with Down Syndrome. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v.18, no.4, 2007.
- DOWN, J.L. Observations on an ethnic classification of idiots. **Lond Hosp Clin Lect Rep**, v. 3, p. 259 -62, 1866.
- DUCKWORTH R.M., MORGAN S.N., MURRAY A.M. Fluoride in saliva and plaque following use of fluoride containing mouthwashes. **J. Dent. Res.** v. 66, no.12, p. 1730-1734, Dec., 1987.
- DUBOIS M, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analyt Chem.**, no. 28, p.350-356, 1956.
- EPSTEIN, J.B.; PEARSALL, N.N. ;TRUELOVE, E.L. Quantitative relationships between candida albicans in saliva and the clinical status of human subjects. **J. Clin. Microbiol.**, v.12, no.3, p. 475-476, Sep. 1980.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico.** São Paulo: Santos, 2005.

FISCHER-BRANDIES, H.; SCHMID, R.G.; FISCHER-BRANDIES, E. Craniofacial development in patients with Down's syndrome from birth to 14 years of age. **Eur. J. Orthod.**, London, v. 8, no. 1, p. 35-42, Feb. 1986.

FISKE, C.H.; SUBARROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal Biological Chemistry**, v. 66, p. 375-377, 1925.

JACOBS, P.A.; BAIKIE, A.G.; COURT-BROWN, W.M.; STRONG, J.A. The somatic chromosomes in mongolism. **Lancet**, v. 1, p. 710, 1959.

KÖHLER B, PETTERSSON BM, BRATTHALL D. Streptococcus mutans in plaque and saliva and the development of caries. **Scand J Dent Res.**, Copenhagen, v. 89, no.1, p. 19-25, 1981.

LEJEUNE, J.; GAUTIER, M.; TURPIN, R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. **C R Hebd Seances Acad Sci** no. 248, p. 1721-1722, 1959.

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. Dental Res.**, 79: 1371-1377, 2000

MOREIRA, M. *Avaliação das condições de saúde bucal e níveis de Streptococcus mutans na saliva de crianças com síndrome de Down.* 2013. 45 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

NOBRE DOS SANTOS, M. et al. Relationship among Dental Plaque Composition, Daily Sugar Exposure and Caries in the Primary Dentition. **Caries Res.**, Basel, v. 36, no. 5, p. 347–352, Sep-Oct. 2002.

NISENGARD R. J.; NEWMAN M. G. *Microbiologia Oral e Imunologia.* 2 ed. Rio de Janeiro: GuanabaraKoogan, p. 395, 1994.

PEARSE E.I., HANCOCK E.M., GALLAGHER I.H. The effect of fluorhydroxyapatite in experimental human dental plaque on its pH, acid production and soluble calcium, phosphate and fluoride levels following glucose challenge. **Arch. Oral Biol.**, v.29, no. 7, p.521-527, 1987.

PEARCE E. Plaque minerals and dental caries. **N Z Dent J.**, Dunedin, v.94, no.415, p. 12-15, Mar., 1998.

SEAGRIFF-CURTIN, P.; PUGLIESE, S.; ROMER, M. Dental considerations for individuals with Down syndrome. **NY State Dent. J.**, New York, v. 72, no. 2, p. 33-35, Mar-Apr. 2006.

SIQUEIRA, W.L. et al. Electrolyte concentrations in saliva of children aged 6–10 years with Down syndrome. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 98, no. 1, p. 76–79, July 2004.

SIQUEIRA, W.L. et al. Salivary parameters in infants aged 12 to 60 months with Down syndrome. **Spec Care Dentist**. Chicago, v. 27, no.5, p. 202-205, Sep-Oct., 2007.

Society NDS. Down Syndrome [cited 2013 14/07/2013]. Available from: <http://www.ndss.org/>.

STABHOLZ, A. et al. Caries experience, periodontal treatment needs, salivary pH, and *Streptococcus mutans* counts in a preadolescent Down syndrome population. **Spec. Care Dentisti.**, Chicago, v.11, no. 5, p. 203–208, Sep-Oct. 1991.

TENUTA, L.M. et al. Ca, Pi, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. **J.Dent Res.**, Chicago, v. 85, no. 9, p. 834-838, Sep. 2006.

VOGEL, G.L.; CHOW L.C.; BROWN W.E. A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. **Caries Res.**, Basel, v. 17, no. 1, p. 23-31, 1983.

VOGEL, G.L. et al. Fluoride analysis in nanoliter- and microliter-size fluid samples. **J.Dent Res.**, Chicago, v. 69, no. 522-528, p. 556-7, Feb. 1990.

## ANEXO

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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