

**BRUNO MELLO DE MATOS**

**AVALIAÇÃO DO RISCO DE CÁRIE E MICROBIOTA  
FÚNGICA EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA  
FALCIFORME**



**2009**

**BRUNO MELLO DE MATOS**

**AVALIAÇÃO DO RISCO DE CÁRIE E MICROBIOTA FÚNGICA EM  
PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

Orientador: Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito

Co-orientador: Profa. Adj. Josefina Aparecida Pellegrini Braga

São José dos Campos

2009

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2008.

M428a Matos, Bruno Mello de.

Avaliação do risco de cárie e microbiota fúngica em pacientes pediátricos com anemia falciforme/ Bruno Mello de Matos. \_\_ São José dos Campos : [s.n.], 2009.

121.f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Prof. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito.

1. Anemia falciforme. 2. Cárie dentária. 3. Saliva. 4. Testes de atividade de cárie dentária 5. *Streptococcus mutans* 6. *Lactobacillus*. 7. Leveduras. I. Koga-Ito, Cristiane II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

t 616.152

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

## AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 06 Agosto de 2009.

Assinatura:

E-mail: mellodematos@yahoo.com.br

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito** (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

**Profa. Associada Maria Stella Figueiredo**

Escola Paulista de Medicina  
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

**Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge**

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

São José dos Campos, 29 de julho de 2009.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Maria de Fátima Gomes de Mello Matos** e **Luiz de Matos**, pelo amor, incentivo, confiança e apoio.

Ao meu irmão, **Rodrigo**, pelo incentivo e confiança.

A todas as crianças que fizeram com que este estudo se tornasse realidade.

Com carinho, dedico este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Adj. José Roberto Rodrigues e do vice-diretor Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da vice-coordenadora, Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À seção de Pós-graduação.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do Auxílio Pesquisa.

Aos meus amigos de tantos anos: Edson e Edinei, pelo apoio e força.

À minha querida amiga Fernanda e minha tia Célia pelo incentivo e força incondicional.

À minha amiga Graziella Nuernberg Back Brito pela ajuda e companheirismo inestimável.

À Ana Paula de Almeida Lourenço pela ajuda no início deste estudo.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia pelo convívio, amizade e cooperação.

Aos alunos de iniciação científica: Zulene Eveline Abreu Ribeiro, Jussimara Akemi Ishikawa, Felipe Eduardo de Oliveira, Aline Júnia Oliveira e Déborah Holleben, pela disposição e ajuda constante.

Aos técnicos do laboratório de Microbiologia: Sérgio Giovanny Alves e Domingos Gonçalves Pontes, pelo apoio.

À seção de triagem da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

Ao Prof. MSc. Ivan Balducci pela realização da análise estatística e disposição em todos os momentos.

Ao Prof. Adj. Sílvio Issao Myaki e aos professores da disciplina de Odontopediatria pela colaboração na realização deste estudo.

À Profa. Dra. Symone Cristina Teixeira pela ajuda na realização da discussão do estudo.

Ao amigo Adolfo José da Mota, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – USP, pela colaboração na realização da PCR.

À Profa. Associada Maria Stella Figueiredo, da disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, por abraçar desde o início, o projeto que deu origem a este trabalho.

Às doutoras Andrea Angel, Patrícia Belintani Blum Fonseca e Roberta Camillo, do ambulatório Hematologia Pediátrica do Hospital São Paulo – UNIFESP, pelo convívio de todas as terças-feiras e pela ajuda e incentivo.

À equipe do ambulatório de Hematologia Pediátrica do Hospital São Paulo – UNIFESP (recepção, equipe de Enfermagem e residentes) que me acolheram como mais um membro da equipe.

À minha co-orientadora Profa. Adj. Josefina Aparecida Pellegrini Braga, da disciplina de Especialidades Pediátricas da Escola

Paulista de Medicina – UNIFESP, pela disposição, ajuda e apoio constante para que esse estudo fosse realizado.

À minha orientadora Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito, pelo convívio desde que iniciei a graduação, pelos ensinamentos e motivação. Pela amizade de sempre, pela força e companheirismo na luta de todos os dias. Por me orientar desde os meus primeiros passos na área científica e por fazer com que eu ame a Microbiologia cada vez mais.

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém  
que acredite que ele possa ser realizado.”

Roberto Shinyashiki

## SUMÁRIO

|                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMO.....</b>                                        | <b>10</b> |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>                | <b>11</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                  | <b>12</b> |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                       | <b>14</b> |
| <b>2.1 Anemia falciforme.....</b>                         | <b>14</b> |
| 2.1.1 Aspectos moleculares da hemoglobina falciforme..... | 14        |
| 2.1.2 Patogênese molecular.....                           | 18        |
| 2.1.3 Epidemiologia.....                                  | 20        |
| 2.1.4 Triagem neonatal e diagnóstico.....                 | 21        |
| 2.1.5 Profilaxia antibiótica.....                         | 23        |
| 2.1.6 Principais manifestações clínicas.....              | 25        |
| 2.1.7 Manifestações orofaciais.....                       | 26        |
| 2.1.7.1 Osteomielite.....                                 | 27        |
| 2.1.7.2 Parestesia.....                                   | 28        |
| 2.1.7.3 Necrose pulpar.....                               | 28        |
| 2.1.7.4 Dor orofacial.....                                | 28        |
| <b>2.2 Cárie dentária.....</b>                            | <b>29</b> |
| 2.2.1 Etiologia da cárie dentária.....                    | 29        |
| 2.2.2 Risco de cárie.....                                 | 34        |
| 2.2.3 Estreptococos do grupo <i>mutans</i> .....          | 35        |
| 2.2.4 Lactobacilos.....                                   | 36        |
| 2.2.5 Leveduras.....                                      | 37        |
| 2.2.6 Saliva.....                                         | 39        |
| <b>3 PROPOSIÇÃO.....</b>                                  | <b>42</b> |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                         | <b>43</b> |
| <b>4.1 Aspectos éticos.....</b>                           | <b>43</b> |
| <b>4.2 Critérios de inclusão.....</b>                     | <b>43</b> |
| <b>4.3 Critérios de exclusão.....</b>                     | <b>44</b> |

|                                                                                  |            |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4.4 Anamnese e exame clínico.....</b>                                         | <b>44</b>  |
| <b>4.5 Coleta das amostras.....</b>                                              | <b>45</b>  |
| <b>4.6 Processamento das amostras.....</b>                                       | <b>45</b>  |
| 4.6.1 Determinação do fluxo salivar.....                                         | 45         |
| 4.6.2 Determinação da capacidade tampão da saliva.....                           | 46         |
| 4.6.3 Contagem de estreptococos do grupo <i>mutans</i> .....                     | 46         |
| 4.6.4 Contagem de lactobacilos.....                                              | 47         |
| 4.6.5 Contagem de leveduras.....                                                 | 47         |
| <b>4.7 Isolamento e obtenção de culturas puras.....</b>                          | <b>48</b>  |
| <b>4.8 Identificação dos isolados de leveduras.....</b>                          | <b>48</b>  |
| 4.8.1 Identificação genotípica de <i>Candida dubliniensis</i> .....              | 49         |
| <b>4.9 Determinação do risco de cárie.....</b>                                   | <b>50</b>  |
| <b>4.10 Análise dos resultados.....</b>                                          | <b>53</b>  |
| <b>5 RESULTADOS.....</b>                                                         | <b>54</b>  |
| <b>5.1 Análise dos dados da ficha clínica.....</b>                               | <b>54</b>  |
| <b>5.2 Análise salivar.....</b>                                                  | <b>62</b>  |
| 5.2.1 Análise do fluxo salivar.....                                              | 62         |
| 5.2.2 Análise da capacidade tampão da saliva.....                                | 64         |
| <b>5.3 Análise microbiológica.....</b>                                           | <b>66</b>  |
| 5.3.1 Contagem de bactérias cariogênicas segundo o antibiótico<br>utilizado..... | 70         |
| <b>5.4 Risco de cárie.....</b>                                                   | <b>71</b>  |
| <b>5.5 Identificação dos isolados de leveduras.....</b>                          | <b>72</b>  |
| 5.5.1 Identificação genotípica de <i>C. dubliniensis</i> .....                   | 74         |
| <b>6 DISCUSSÃO.....</b>                                                          | <b>75</b>  |
| <b>7 CONCLUSÃO.....</b>                                                          | <b>91</b>  |
| <b>8 REFERÊNCIAS.....</b>                                                        | <b>92</b>  |
| <b>APÊNDICES.....</b>                                                            | <b>114</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>                                                               | <b>117</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                             | <b>121</b> |

Matos BM. Avaliação do risco de cárie e microbiota fúngica em pacientes pediátricos com anemia falciforme [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2009.

## RESUMO

Crianças com anemia falciforme são submetidas à terapia antibiótica profilática prolongada com penicilina. Pouco se sabe a respeito dos efeitos desta terapia sobre a microbiota bucal. O objetivo do estudo foi avaliar a microbiota cariogênica, fluxo e capacidade tampão salivar de pacientes pediátricos com anemia falciforme, determinando o risco de cárie. Além disso, avaliar a microbiota fúngica nestes pacientes em relação ao grupo controle. Foi coletada saliva estimulada de 25 crianças (4 a 11 anos) com anemia falciforme (genótipo SS), de ambos os gêneros. Um grupo controle pareado quanto à idade e gênero foi incluído. Foi realizado exame clínico para verificação do índice ceo-d/CPO-D; o fluxo salivar e a capacidade tampão salivar foram avaliados. Alíquotas de saliva e diluições foram semeadas em meios seletivos para estreptococos do grupo *mutans*, lactobacilos e leveduras. Após a incubação, o número de UFC/mL de saliva foi calculado. Amostras de leveduras foram isoladas, e identificadas pelo sistema API 20C AUX, além de PCR específico para *C. dubliniensis*. Os dados obtidos por meio do questionário, dados salivares e microbiológicos foram analisados pelo software Cariograma. Os resultados foram comparados pelo teste t de Student, teste Z e Mann-Whitney. Não foi observada diferença estatisticamente significativa para o fluxo ( $p = 0,097$ ) e capacidade tampão salivar ( $p = 0,103$ ) entre os grupos de estudo. A contagem de leveduras foi significativamente mais elevada no grupo de estudo ( $p = 0,017$ ). As contagens de estreptococos do grupo *mutans* e lactobacilos não diferiram significativamente entre o grupo teste e o grupo controle ( $p = 0,741$  e  $p = 0,423$ , respectivamente). Considerando estes resultados em conjunto com os demais parâmetros avaliados, concluiu-se que o risco de cárie entre os grupos não diferiu ( $p = 0,762$ ). No grupo de estudo foram identificados: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. rugosa*, *C. sphaerica* e *C. tropicalis*. No grupo controle foram identificados: *C. albicans*, *C. famata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *S. cerevisiae*. Concluiu-se que a maior parte dos pacientes pediátricos com anemia falciforme apresentou risco de cárie alto e muito alto, assim como o grupo controle. Porém os níveis salivares de leveduras foram mais elevados nas crianças com anemia falciforme em relação ao grupo controle.

Palavras-chave: Anemia falciforme. Cárie dentária. Saliva. Testes de atividade de cárie dentária. *Streptococcus mutans*. *Lactobacillus*. Leveduras.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AF = Anemia falciforme
- ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC = American Type Culture Collection
- ceo-d = Índice de dentes decíduos cariados, com extração indicada e obturados
- ceo-s = Índice de superfícies cariadas, com extração indicada e obturadas em dentes decíduos
- CPO-D = Índice de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados
- CPO-S = Índice de superfícies cariadas, perdidas e obturadas em dentes permanentes
- DF = Doença falciforme
- EGM = Estreptococos do grupo *mutans*
- HbA = Hemoglobina A
- HbA<sub>2</sub> = Hemoglobina A<sub>2</sub>
- HbF = Hemoglobina fetal
- HbS = Hemoglobina S
- Hib = *H. influenzae* tipo b
- HPLC = Cromatografia líquida de alta performance
- mg = Miligrama
- NCPF = National Collection of Pathogenic Fungi
- O<sub>2</sub> = Oxigênio
- OMS = Organização Mundial da Saúde
- pb = Pares de bases
- PCR = Reação em cadeia da polimerase
- pH = Potencial hidrogênio-iônico
- UFC/mL = Unidades formadoras de colônias por mililitro
- UI = Unidade Internacional
- μL = Microlitro

## 1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é o primeiro segmento do trato digestivo e é composta por inúmeras estruturas diferentes, como os dentes, sulcos gengivais, mucosas e a língua, que por sua vez, apresentam características físicas, químicas e nutricionais diferentes, que podem predispor a eliminação ou colonização por microrganismos (Hägg et al., 2004; Prieto-Prieto; Calvo, 2004; Aas et al., 2005). Além disso, muitos fatores, intrínsecos e extrínsecos, têm efeito sobre a composição, atividade metabólica e patogenicidade da diversificada microbiota bucal. Portanto, a cavidade bucal representa um ecossistema complexo e heterogêneo, sendo habitada por mais de setecentas espécies de microrganismos, aeróbios e anaeróbios, que colonizam os diferentes nichos bucais (Hägg et al., 2004; Prieto-Prieto; Calvo, 2004).

O diagnóstico da atividade de cárie foi baseado durante muitos anos exclusivamente no conhecimento do número total de dentes ou superfícies apresentando lesões de cárie (Thenisch et al., 2006). Este método, no entanto, não acompanhava o caráter dinâmico do processo de cárie, não permitindo que novas lesões fossem efetivamente evitadas. Desta forma, surgiram os testes microbiológicos e salivares para avaliação do risco de cárie, os quais em conjunto com a análise clínica e de outras variáveis envolvidas na patogênese da cárie permitiram um diagnóstico mais preciso (Sampaio et al., 2003; Siudikiene et al., 2006). Considerando a etiologia multifatorial da cárie dentária, a combinação de vários testes para a obtenção de um diagnóstico final de risco de cárie parece necessário (Anderson et al., 1993; van Houte, 1993; Sampaio et al., 2003).

Os estreptococos do grupo *mutans* (EGM) são considerados como principal causador da cárie de superfícies lisas (de Carvalho et al., 2006; Thenisch et al., 2006). A contagem deste grupo de microrganismos é freqüentemente utilizada para o diagnóstico e propósitos preditivos em Cariologia (Koga-Ito et al., 2003; Zhang et al., 2007), visto que a correlação entre alta contagem de EGM e alta atividade de cárie tem sido relatada por vários autores (Aguilera Galaviz et al., 2005; Ercan et al., 2007).

Contagens de leveduras e lactobacilos também têm sido associadas à atividade de cárie (Pienihäkkinen et al., 1988; Twetman et al., 1999; Sampaio et al., 2003; de Carvalho et al., 2006). Correlação entre testes salivares e microbiológicos e experiência de cárie tem sido relatada na literatura (Mattos-Graner et al., 1998; Gábris et al., 1999).

A anemia falciforme (AF) é a doença hereditária mais freqüente no Brasil (Ramalho et al., 2008). Considerando-se que pacientes pediátricos com anemia falciforme são tratados com antibioticoterapia profilática prolongada com penicilina, julgou-se de importância avaliar se esta terapia influencia na presença de microrganismos cariogênicos na cavidade bucal (EGM, lactobacilos e leveduras), assim como na experiência de cárie (índice ceo-d/CPO-D).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Anemia falciforme

#### 2.1.1 Aspectos moleculares da hemoglobina falciforme

A hemoglobina é uma proteína composta por quatro globinas, associadas a grupos heme, complexo formado por um átomo de ferro em uma estrutura porfírica. A porção protéica da hemoglobina consiste em dois pares de cadeias polipeptídicas. Nos adultos normais, há duas cadeias alfa e duas cadeias beta, formando a hemoglobina A (HbA), e duas cadeias alfa e duas delta para a hemoglobina A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>). Durante o desenvolvimento fetal predomina a síntese de cadeias gama no lugar das cadeias beta, que, associadas às cadeias alfa, originam a hemoglobina fetal (HbF) (Piratininga, 2000; Zamaro et al., 2002).

Quadro 1 – Tipos de hemoglobinas humanas (continua)

| <b>Tipo de hemoglobina</b> | <b>Período de síntese</b>      | <b>Cadeias globínicas</b> |
|----------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Portland                   | Embrião/até 3º mês de gestação | $\xi_2\gamma_2$           |
| Gower I                    | Embrião/até 3º mês de gestação | $\xi_2\varepsilon_2$      |
| Gower II                   | Embrião/até 3º mês de gestação | $\alpha_2\varepsilon_2$   |
| Hb Fetal                   | Feto/até 6º mês de vida        | $\alpha_2\gamma_2$        |

Quadro 1 – Tipos de hemoglobinas humanas (conclusão)

|                  |                  |                    |
|------------------|------------------|--------------------|
| HbA <sub>2</sub> | Feto/vida adulta | $\alpha_2\delta_2$ |
| HbA              | Vida adulta      | $\alpha_2\beta_2$  |

Baseado em Galiza Neto e Pitombeira (2003)

A HbA perfaz 92% do total em adultos normais. A HbA<sub>2</sub> representa 2,5%. A HbF representa 50 a 85% da concentração total em fetos e recém-nascidos, declinando rapidamente após o parto e alcançando concentrações de 10 a 15% no quarto mês de vida e menos de 1% aos 3 ou 4 anos de idade. A HbF é produzida em pequena quantidade em adultos. As hemoglobinas Gower I, Gower II e Portland estão presentes na vida embrionária, antes de 7 a 10 semanas de gestação (Gay et al., 1997).

Mutações nos genes das globinas podem levar à produção de hemoglobinas estruturalmente alteradas. Há, atualmente, mais de 900 variantes estruturais descritas, a maioria ocasionada por simples substituições de bases no DNA, com a correspondente troca de aminoácidos na proteína. Embora a maior parte dos casos seja de cadeias  $\beta$ , alterações de cadeias  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  são também relativamente comuns. Há um grande contingente não relacionado à sintomatologia clínica, mas algumas alterações afetam a estabilidade e/ou solubilidade da molécula ou modificam suas propriedades funcionais, levando às anemias hemolíticas e às eritrocitoses e cianoses, respectivamente. Há ainda variantes alongadas ou extremamente instáveis que resultam em fenótipos talassêmicos. Entre as variantes clinicamente importantes, a HbS, da AF, é sem dúvida a mais conhecida (Kimura et al., 2008).

O gene falciforme resulta de uma mutação pontual que causa a substituição do aminoácido ácido glutâmico na sexta posição da cadeia  $\beta$  da hemoglobina para valina. Essa substituição é devida a uma alteração na segunda base nitrogenada do códon, no DNA do

cromossomo 11, que codifica o ácido glutâmico, onde a adenina é substituída pela timina, ou seja, GAG para GTG (Manfredini et al., 2007), ocasionando o surgimento da hemoglobina patológica.

A simples troca de um único aminoácido na composição da cadeia beta globínica ocasiona o surgimento de uma estrutura nova, denominada hemoglobina S (onde a letra S deriva da palavra inglesa *sickle*, que em português traduz-se como foice) (Galiza Neto; Pitombeira, 2003), ao invés da hemoglobina normal chamada hemoglobina A (Manfredini et al., 2007).

A denominação “AF” é reservada para a forma da doença que ocorre em indivíduos homozigotos (HbSS). Entretanto, o gene da HbS pode-se combinar com outras anormalidades hereditárias das hemoglobinas, como hemoglobina C (HbC), hemoglobina D (HbD) e  $\beta$ -talassemia. No conjunto, todas essas formas sintomáticas do gene HbS, em homozigose ou em combinação, são conhecidas como doenças falciformes (DF) (Redding-Lallinger; Knoll, 2006; Manfredini et al., 2007).

O traço falciforme – heterozigose para o gene da HbS – constitui uma condição relativamente comum e clinicamente benigna em que o indivíduo herda de um dos pais o gene para a HbA e do outro o gene para a HbS. O gene da HbS tem uma ampla distribuição nos vários continentes, sendo mais elevada nos países da África equatorial, Arábia, Índia, Israel, Turquia, Grécia e Itália (Murao; Ferraz, 2007).

Embora todo paciente com AF apresente a mesma mutação genética, a diversidade relativa à gravidade das manifestações clínicas é notável, que pode cursar com quadros de maior gravidade, outros mais benignos e alguns quase assintomáticos. Vários fatores modificadores vêm sendo estudados com o intuito de definir o porquê dessa diversidade. Os mais importantes atualmente são: os níveis de HbF, a coexistência de outras hemoglobinopatias hereditárias e finalmente, os diferentes haplótipos para a HbS (Laguardia, 2006).

Os níveis de HbF correspondem a menos de 1% da hemoglobina total em indivíduos maiores de um ano de idade, porém há casos onde eles se encontram bem mais elevados devido a fatores hereditários. Esses indivíduos apresentam menor gravidade da AF, já que as moléculas de HbF não participam do processo de polimerização que ocorre entre as moléculas de HbS desoxigenada (desoxi HbS) (Bunn, 1997).

A associação da DF com outras hemoglobinopatias hereditárias é relativamente freqüente e leva a uma diversidade de quadros clínicos, que variam desde formas assintomáticas até as mais graves (Laguardia, 2006).

Os últimos fatores moduladores conhecidos atualmente são os haplótipos da HbS, que podem ser descritos como sítios polimórficos de endonucleases de restrição, localizados no interior do gene da cadeia beta mutante. Apesar de possuírem identificação numérica, eles são mais comumente designados de acordo com a área geográfica onde foram primeiramente identificados: Senegal, Benin, CAR ("Central Africa Republic" ou Bantu) e Asiático (Indu Árábico). Foi descrito também o haplótipo Cameroon, localizado em um único grupo étnico na República de Camarões (Gay et al., 1997).

Na América, os haplótipos mais comuns são: Senegal, Benin e CAR (Pante-de-Sousa et al., 1998). No Brasil os haplótipos mais freqüentes encontrados foram Bantu (66%), Benin (21,8%), Senegal (10,9%) e Cameroon (1,3%) (Cardoso; Guerreiro, 2006).

Além disso, a variabilidade clínica da AF também é influenciada por fatores ambientais, por exemplo, o nível sócio-econômico, o acesso à assistência médica e a prevenção de infecções (Laguardia, 2006).

Pacientes com o haplótipo Senegal, geralmente, apresentam formas clínicas mais brandas, enquanto aqueles com

haplótipo CAR as mais graves. Pacientes com haplótipo Benin apresentam formas com gravidade intermediária (Gay et al., 1997).

O mecanismo pelo qual cada haplótipo influencia na gravidade da doença permanece um mistério. Estudos comprovam que cada um deles possui níveis diferentes de HbF. Os pacientes com o haplótipo Senegal, por exemplo, apresentam mais de 20% de HbF (Gay et al., 1997).

Os haplótipos representam uma área relativamente nova de investigação a respeito da variação da DF. Seus mecanismos ainda não foram bem caracterizados e os antropologistas utilizam para traçar a migração dos genes da AF da África para o Mediterrâneo e para o continente americano (Gay et al., 1997).

### 2.1.2 Patogênese molecular

A hemoglobina mutante (HbS) possui propriedades físico-químicas bastantes diferentes da hemoglobina normal devido à perda de duas cargas elétricas por molécula de hemoglobina (devido à perda do ácido glutâmico). Exibe ainda diferente estabilidade e solubilidade, demonstrando uma forte tendência à formação de polímeros quando na sua forma de desoxiemoglobina. Decorre daí uma série de alterações físico-químicas na estrutura da hemácia, ocasionando a deformação e o enrijecimento de sua membrana celular, concorrendo para o epifenômeno patológico que é a vasclusão. Este fenômeno é responsável por toda a seqüência de alterações estruturais e funcionais nos mais diversos órgãos e sistemas do paciente acometido (Galiza Neto; Pitombeira, 2003).

A HbS no estado de baixa tensão de oxigênio sofre uma modificação na sua conformação molecular devido à presença do aminoácido valina, que interage com o receptor fenilalanina e leucina na

molécula adjacente de HbS. Esta interação de natureza hidrofóbica desencadeia a formação de polímeros, compostos por 14 fibras de desoxiemoglobinas, enoveladas entre si, num processo denominado nucleação, que progride com o alongamento e alinhamento de mais fibras, criando uma estrutura multipolimérica, na forma de um eixo axial no interior da célula. Está criado assim o mecanismo de transformação da clássica forma do eritrócito em uma nova estrutura no formato de foice (Galiza Neto; Pitombeira, 2003).

A velocidade e a extensão da formação de polímeros no interior das hemácias depende primariamente de três variáveis independentes: grau de desoxigenação, concentração intracelular de HbS e presença ou ausência de HbF. Uma das consequências da polimerização da HbS é a desidratação celular devida às perdas de íons potássio ( $K^+$ ) e de água. Os principais mecanismos destas perdas ocorrem pela ativação excessiva do canal de transporte dos íons potássio e cloro ( $K^+$ ,  $Cl^-$ ), estimulados pela acidificação, pelo edema celular e pelo canal de Gardos, devido ao aumento da concentração dos íons cálcio ( $Ca^{++}$ ) (Galiza Neto; Pitombeira, 2003).

O afoiçamento das hemácias tem como consequências menor capacidade de transporte de oxigênio para os tecidos, dificuldades circulatórias e diminuição de sua vida útil, que passa de 120 para aproximadamente 20 dias, quando são retiradas da circulação pelo baço (Rosa; Magalhães, 2002).

Outra importante alteração da hemácia na AF se deve à perda do seu poder deformatório, fato que lhe impossibilita transpor o menor diâmetro dos capilares da microcirculação. A perda da elasticidade da célula deve-se ao incremento da concentração de HbS intracelular, resultando no aumento da viscosidade no citosol, à polimerização da HbS e à rigidez da membrana (Galiza Neto; Pitombeira, 2003).

A alteração celular causada pelo processo de falcização influencia intensamente o fluxo sanguíneo, aumentando a sua

viscosidade. Os eritrócitos falciformes irreversíveis têm capacidade aumentada de adesão ao endotélio vascular, principalmente, devido à alta viscosidade do sangue e também pela elevação dos níveis de fibrinogênio, que ocorre como resposta natural à infecções (Manfredini et al., 2007).

A adesividade pode ser devida às forças eletrostáticas. A deposição de grande número de eritrócitos alterados na superfície endotelial reduz a luz dos capilares, provocando estase, que poderá se intensificar pela diminuição da temperatura do ambiente. Como consequência da estase, ocorre hipóxia tecidual, levando mais moléculas de HbS no estado desoxigenado, piorando a situação circulatória já desfavorável e lesando os tecidos perfundidos por estes capilares (Manfredini et al., 2007).

### 2.1.3 Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, a cada ano, nascem no mundo, cerca de 300 mil crianças portadoras de hemoglobinopatias, das quais, mais de 200 mil são africanas com AF (Watanabe et al., 2008).

A AF é provavelmente a doença hematológica hereditária mais prevalente na população brasileira. Tendo se originado na África e trazida à América pela imigração forçada dos escravos, a partir do século XVI, é mais freqüente onde a proporção de antepassados negros é maior. A doença distribui-se heterogeneamente no Brasil em virtude da miscigenação racial, favorecendo assim a continuidade dessa anemia no país (Pinheiro et al., 2006; Ramalho et al., 2008).

A população brasileira não branca foi estimada em 44,66% pelo censo demográfico de 2000, sendo que de 1% a 6% dessa população são portadores do gene da HbS (Watanabe et al., 2008).

Apesar de afetar cerca de 0,1% a 0,3% da população negróide brasileira, a AF é observada em parcela cada vez mais significativa da população caucasóide, em decorrência da alta miscigenação observada no Brasil. As regiões onde a condição tanto de portador quanto de doente é mais prevalente são Sudeste e Nordeste (Bandeira et al., 2007; Mousinho-Ribeiro et al., 2008).

No Brasil, a AF tem significativa importância epidemiológica em virtude da prevalência e da morbimortalidade que apresenta e, por isso, tem sido apontada como uma questão de saúde pública (Bandeira et al., 2007).

#### 2.1.4 Triagem neonatal e diagnóstico

O diagnóstico das hemoglobinopatias é complexo e envolve uma análise que deve considerar, além dos dados clínicos e herança genética, vários fatores como idade da criança por ocasião da coleta, tempo de estocagem e condições de armazenamento da amostra (desnaturação da hemoglobina), entre outras (Ferraz; Murao, 2007).

O Ministério da Saúde (2005), por meio da Portaria Ministerial nº 822, de julho de 2001, instituiu o Programa Nacional de Triagem Neonatal para fenilcetonúria e hipotireoidismo (fase I), hemoglobinopatias (fase II) e fibrose cística (fase III) em todo o país. Este exame é realizado em sangue total colhido do calcanhar, na primeira semana de vida da criança e é conhecido como teste do pezinho.

Os recém-nascidos diagnosticados pela triagem neonatal como prováveis portadores de DF devem ser reavaliados antes do 3º mês

de vida, pois permite a identificação precoce desses indivíduos e a conseqüente introdução de profilaxia e seguimento ambulatorial adequado (Silla, 1999; Ferraz; Murao, 2007).

Para os pacientes que não foram submetidos à triagem neonatal e para diagnóstico diferencial entre as diferentes formas de DF, além dos sinais e sintomas clínicos, os seguintes exames podem ser utilizados (Bandeira et al., 2003; Pinheiro et al., 2006; Ferraz; Murao, 2007):

- a) eletroforese em pH alcalino em acetato de celulose;
- b) eletroforese em pH ácido em ágar citrato ou gel de agarose;
- c) focalização isoelétrica (IEF);
- d) cromatografia líquida de alta performance (HPLC);
- e) pesquisa de drepanóticos e/ou teste de solubilidade;
- f) dosagem de HbF pela técnica de desnaturação alcalina ou por HPLC;
- g) dosagem de HbA<sub>2</sub> por microcromatografia em coluna ou por HPLC;
- h) hemograma completo e reticulócitos;
- i) teste de falcização;
- j) estudo do sangue dos pais (estudo familiar).

### 2.1.5 Profilaxia antibiótica

Infecções graves, tais como pneumonia, sepse e meningite, são as causas mais comuns de morte entre crianças com AF menores de 5 anos de idade. Iniciada entre 3 e 4 meses até os 5 anos, a penicilina é administrada como uma medida preventiva contra estas infecções causadas principalmente por *Streptococcus pneumoniae* (Zarkowsky et al., 1986; Pegelow et al., 1991).

O risco de infecção por pneumococos em crianças menores de 5 anos é aproximadamente 30 a 100 vezes maior que em crianças saudáveis (Loggetto et al., 1999; Bitarões et al., 2008).

Como consequência da asplenia, haverá uma maior susceptibilidade às infecções por organismos encapsulados, notadamente *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) e pneumococos (Loggetto et al., 1999; Wilkins, 2002). Essas infecções podem desencadear e/ou intensificar as crises de falcização. Nessas condições, forma-se um círculo vicioso perigoso para o paciente, que pode ser letal se não tratado adequadamente. Este fato justifica a busca por profilaxia e abordagens eficazes (Di Nuzzo; Fonseca, 2004).

Entretanto, outros microrganismos também podem estar relacionados às infecções em pacientes com AF tais como: *Klebsiella* e *Escherichia coli*. A presença de infecção por estes microrganismos pode ter predileção por sexo e/ou faixa etária do paciente (Magnus et al., 1999). A profilaxia de complicações da própria doença é indispensável para uma evolução o menos desfavorável possível nesses indivíduos. Quatro são os passos fundamentais (Di Nuzzo; Fonseca, 2004):

- a) diagnóstico neonatal seguido de orientação e programa de educação familiar, através de regular acompanhamento ambulatorial;

- b) profilaxia medicamentosa com penicilina;
- c) vacinação contra pneumococos e Hib nas idades apropriadas;
- d) identificação precoce e manejo apropriado dos episódios febris, considerando-os como potenciais eventos sépticos.

Isso reduz de maneira significativa as mortes associadas a esta enfermidade, principalmente por problemas infecciosos (de 30 para 1%), além de proporcionar a chance de melhor qualidade de vida (Gómez-Chiari et al., 2003).

Segundo a ANVISA (2002), a penicilina profilática previne 80% das septicemias por pneumococos em crianças com AF até 3 anos de idade. O impacto da profilaxia é enorme e deve ser iniciado aos 3 meses de idade para todas as crianças com DF. A terapêutica deve continuar até 5 anos de idade. Pode-se utilizar a forma oral (Penicilina V) ou parenteral (Penicilina benzatina), na seguinte posologia:

- a) Penicilina V (administrada via oral duas vezes ao dia);
  - 125 mg para crianças até 3 anos de idade ou 15 Kg;
  - 250 mg para crianças de 3 a 6 anos de idade ou com 15 a 25 Kg;
  - 500 mg para crianças com mais de 25 Kg.
- b) Penicilina benzatina (administrada intramuscular a cada 21 dias).
  - 300000 UI para crianças até 10 Kg;
  - 600000 UI para crianças até de 10 a 25 Kg;
  - 1200000 UI para crianças com mais de 25 Kg.

Segundo Norris et al. (1996) e Fonseca et al. (2005) a profilaxia com penicilina não parece aumentar a taxa de colonização por cepas de pneumococos resistentes. Isso parece indicar que a penicilina ainda é segura tanto para a profilaxia quanto para o tratamento inicial dos episódios febris nas crianças falcêmicas (Fonseca et al., 2005).

Em casos de alergia à penicilina, administra-se 20 mg/Kg de eritromicina etilsuccinato via oral, 2 vezes ao dia (ANVISA, 2002).

Além disso, a complementação com ácido fólico é indispensável e deve ser administrado diariamente, devido à sua fundamental importância na maturação e na velocidade de produção das hemácias (Rosa; Magalhães, 2002).

Até o momento, duas formas de terapia podem ser utilizadas alternativamente ao tratamento convencional das DF, como a administração oral de hidroxiuréia, um agente indutor da síntese de HbF, e o transplante de medula óssea. Os resultados com a hidroxiuréia são muito animadores tanto em adultos quanto em crianças. Sendo a hidroxiuréia um agente que induz depressão da medula óssea, atenção especial deve ser tomada em relação ao número de granulócitos, plaquetas e reticulócitos. Já o transplante de medula óssea ainda tem uma indicação restrita e é apenas realizado em um grupo selecionado de pacientes (ANVISA 2002; Iannone et al., 2005; Hankins et al., 2005).

#### 2.1.6 Principais manifestações clínicas

As manifestações clínicas da DF variam acentuadamente entre os genótipos da doença. O recém-nascido é protegido pelos elevados níveis de HbF nas hemácias durante as primeiras 8 a 10 semanas de vida. Como estes níveis declinam, as manifestações clínicas da AF aparecem (Beutler, 1995; Embury, 1997).

O paciente típico é anêmico, tendo um estado de saúde razoável e estável. Este estado é interrompido periodicamente por uma crise que pode ter um início súbito e, ocasionalmente, um desfecho fatal. O reconhecimento precoce e a subsequente avaliação clínica das crises são de extrema importância para a diminuição da morbimortalidade (Beutler, 1995).

As manifestações clínicas da AF podem acometer os mais diversos órgãos e sistemas. Alguns dos sintomas clínicos são: crise aplásica (parada transitória da eritropoiese), crises álgicas, crises vasoclusivas, febre, implicações psicossociais, priapismo, seqüestro esplênico, síndrome torácica aguda e úlceras de perna (Embury, 1997; Redding-Lallinger; Knoll, 2006; Braga, 2007).

#### 2.1.7 Manifestações orofaciais

Virtualmente, qualquer tecido ou órgão pode ser afetado na AF e o espectro clínico de envolvimento pode variar muito de paciente para paciente (Ministério da Saúde, 2005).

Problemas bucais têm sido relatados na literatura, porém não são tão comuns quanto outras complicações sistêmicas, além de não serem patognomônicos da doença (Rosa; Magalhães, 2002).

Os sinais mais comumente descritos na literatura são: esclerótica amarelada, palidez da mucosa bucal e da língua, atraso da erupção dos dentes, transtornos na mineralização do esmalte dentário e da dentina. Em alguns casos, observa-se maloclusão devido à protrusão da maxila e retrusão dos dentes anteriores; a protrusão maxilar, nesses casos, tem sido associada ao aumento da atividade da medula óssea desses pacientes. Devido ao “overjet”, cresce a pressão dos lábios sobre

os dentes anteriores, promovendo a retrusão dos incisivos (Taylor et al., 1995; Kelleher et al., 1996; Rosa; Magalhães, 2002).

Além dos sinais descritos anteriormente, alguns autores citam: aumento do espaço medular da mandíbula e afilamento da cortical, zonas osteoporóticas na região de pré-molares e molares superiores, aumento da espessura do cemento, detecção de calcificações pulpaes e perda da altura do osso alveolar. Nas radiografias de crânio, em determinados casos, podem ser observadas projeções semelhantes a “fios de cabelo”, devido à formação secundária de osso, compensatória para a reabsorção óssea que pode ocorrer durante a expansão da medula óssea (Kelleher et al., 1996; Piratininga, 2000; Rosa; Magalhães, 2002).

#### 2.1.7.1 Osteomielite

É mais comum em ossos longos, entretanto pode também afetar ossos faciais. A mandíbula é particularmente mais afetada devido ao suprimento sanguíneo relativamente limitado. Uma crise vasoclusiva leva à isquemia e necrose do osso, criando um ambiente favorável para o crescimento bacteriano. A microbiota bucal pode invadir esta área via ligamento periodontal ou hematológica (Rada et al., 1987; Kelleher et al., 1996).

A infecção por *Salmonella* tem sido relatada em mais de 50% dos casos citados na literatura. A infecção por estreptococos também é muito freqüente devido a sua disseminação direta no tecido ósseo através de focos de infecção dentária e/ou periodontal (Rada et al., 1987; Rosa; Magalhães, 2002).

Estafilococos, pneumococos, pseudomonas, *E. coli*, *H. influenzae* também têm sido citados (Ministério da Saúde, 2005).

#### 2.1.7.2 Parestesia

A crise vasoclusiva na mandíbula pode afetar o nervo alveolar inferior, resultando em parestesia que pode permanecer por mais de 2 anos. A perda da sensação é resultado do comprometimento da circulação regional, agravado pelo estreito canal mandibular, comprometendo também da artéria alveolar inferior (Kelleher et al., 1996; Rosa; Magalhães, 2002).

O nervo mentoniano também pode ser afetado, resultando em parestesia do lábio inferior e podendo durar até 18 meses (Kelleher et al., 1996; Ministério da Saúde, 2005).

#### 2.1.7.3 Necrose pulpar

As hemácias falciformes são suspeitas de comprometer a microcirculação da polpa dentária. Estudos observaram necrose pulpar assintomática em dentes saudáveis de pacientes com AF. Acredita-se que as hemácias falciformes causem vasoclusão na microcirculação pulpar, resultando em necrose. Hemácias falciformes foram identificadas na polpa de dentes com história de pulpíte recorrente (Kelleher et al., 1996; Rosa; Magalhães, 2002).

#### 2.1.7.4 Dor orofacial

Pacientes com DF apresentam o risco nove vezes maior de experimentar a dor na área maxilofacial (Ministério da Saúde, 2005).

Estudos demonstraram que 21% a 36% dos pacientes com DF relataram experiência de dor de dente sem nenhuma patologia específica associada (Cox, 1984; O'Rourke; Hawley, 1998).

## **2.2 Cárie dentária**

### **2.2.1 Etiologia da cárie dentária**

A cárie é uma doença multifatorial e infecto-contagiosa, de caráter crônico, causada pelo processo de desmineralização da superfície dentária por ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático, provenientes da fermentação dos carboidratos da dieta, pelas bactérias (Leites et al., 2006).

Envolve a interação de fatores do hospedeiro suscetível (dentes, película adquirida, saliva), dieta e microbiota. Newbrum (1988) acrescentou mais um fator – o tempo – que deve ser considerado em qualquer discussão sobre a etiologia da cárie. É um processo dinâmico, o qual, em estágios iniciais, é reversível e até mesmo em seus estágios mais avançados, pode ser paralisado (Almeida et al., 2002).

Manji e Fejerskov (1990) demonstraram as relações entre o biofilme dentário e os múltiplos determinantes biológicos que influenciam a possibilidade de desenvolvimento da lesão de cárie. Os dentes são colonizados por bactérias que existem no biofilme dentário, cujo metabolismo ocasiona flutuações no pH. Este metabolismo é influenciado por fatores determinantes que por si só não levam ao desenvolvimento de cárie, mas modulam sua atividade. Entre estes encontramos a composição do próprio biofilme dentário, composição e

capacidade tampão da saliva, velocidade da secreção salivar e composição e frequência da dieta.

Além dos fatores determinantes para o desenvolvimento da cárie, existem os fatores confundidores, que são aqueles que variam de população para população nos quais se incluem os fatores sócio-econômicos, educacionais e comportamentais (Weyne; Harari, 2001). O status socioeconômico é um forte preditivo do risco de cárie em crianças do que em adultos. A cárie é geralmente mais prevalente em grupos de baixo nível socioeconômico do que em grupos de alto nível. Devem ser levadas em consideração as variáveis sociais tais como: o nível de instrução do paciente e sua profissão (Petersen, 1983).

O desenvolvimento da cárie somente ocorre na presença de microrganismos na superfície dentária, contudo, a simples presença destes não é suficiente para o desenvolvimento da doença (Leites et al., 2006).

Segundo Lorenzo e Lorenzo (2004), para que uma espécie microbiana seja reconhecida como iniciadora do processo cariogênico, principalmente no esmalte dentário, é indispensável que ela seja dotada de mecanismos de virulência que a capacitem promover a desmineralização da superfície dentária:

01. Atividade acidogênica intensa: de acordo com o conhecimento atual, as únicas bactérias que preenchem esse primeiro e indispensável requisito (acidogênese intensa) são os EGM, que geram pH em torno de 4,0, e algumas espécies de lactobacilos, que geram pH próximo de 3,0. Em 1991, foi descrito que os estreptococos não-*mutans* produtores de pH baixo (*S. anginosus*, *S. gordonii*, *S. mitis* e *S. oralis*) também são capazes de gerar pH entre 4,05 e 5,0 (Van Houte et al., 1991).
02. Aderência à superfície dentária: os EGM utilizam vários mecanismos para aderir ao dente, principalmente nas superfícies lisas onde a fixação bacteriana é mais dificultosa; no entanto, essas espécies só colonizam consistentemente a superfície dentária quando favorecidas pela presença constante de sacarose. Por outro lado,

os lactobacilos necessitam encontrar zonas retentivas para implantar-se na superfície do dente. 03. Produção de polissacarídeos de reserva: o glucano insolúvel, entre outros polissacarídeos, é uma substância fundamental para que os EGM consigam se aderir e, posteriormente colonizar a superfície dentária. Além disso, são responsáveis pela consistência gelatinosa do biofilme dentário, possibilitando a concentração de ácidos na interface biofilme-esmalte e, ainda, conseqüentemente, gera demora na neutralização dos ácidos. 04. Aciduricidade: algumas raras espécies suportam ambientes ácidos. Aciduricidade é a capacidade de algumas bactérias conseguirem metabolizar mesmo quando o pH torna-se ácido, visto que o pH do ecossistema da cárie dentária é inferior a 5,5.

Segundo Baldani et al. (1996), apesar de alguns autores admitirem que as condições de saúde bucal melhoraram nas últimas décadas no Brasil, a cárie permanece como um grande problema de saúde pública. Como possíveis causas para o declínio observado nos índices de cárie, os autores citam a adição de íon flúor na água de abastecimento público, o emprego em larga escala de dentifrícios fluoretados e a reforma dos serviços de saúde, que acompanharam a implantação do Sistema Único de Saúde. Outras causas importantes seriam, em alguns países, o consumo diferenciado de açúcares e a melhoria nas condições de vida da população.

Um grupo de risco para a doença cárie pode ser definido como um subgrupo da população cujos membros, na média, tenham um risco mais alto de desenvolvimento de novas lesões de cárie do que os membros da população restante, ou seja, um indivíduo com risco de desenvolver a doença cárie é uma pessoa exposta a fatores conhecidos de risco (Thylstrup; Fejerskov, 1994).

O risco para as doenças crônicas pode ser avaliado com base no número de fatores potenciais de risco que cada paciente apresenta. A identificação e a avaliação desses fatores em cada paciente

são imprescindíveis para o diagnóstico e o plano de tratamento (Almeida Júnior et al., 2005).

Weyne e Harari (2001) explica a dinâmica do desenvolvimento da lesão de cárie por meio do processo de desmineralização e remineralização. O primeiro ocorre depois da ingestão de carboidratos quando há uma produção de ácidos por determinadas bactérias presentes no meio bucal, e conseqüentemente atinge-se na cavidade bucal um pH menor que 5,5. Portanto, a concentração de íons cálcio (Ca) e fosfato (P) na saliva torna-se inferior em relação ao produto de solubilidade da hidroxiapatita e, deste modo, a tendência físico-química é o esmalte dentário perder Ca e P para o meio bucal, tentando atingir um novo estado de equilíbrio em função do pH atingido, levando à dissolução do esmalte dentário. O segundo ocorre quando o pH retorna ao normal, ou seja, maior do que 5,5, momento este em que o Ca e P da saliva vão superar o produto da solubilidade da hidroxiapatita, quando o esmalte dentário ganha Ca e P do meio bucal, no sentido de repor o que foi perdido anteriormente. Na ocorrência desse fenômeno, haverá remineralização do esmalte dentário. A cárie será, portanto, conseqüência do desequilíbrio entre os fatores de desmineralização e remineralização.

A ingestão de sacarose é um importante fator etiológico para o desenvolvimento de cáries (Burt; Pai, 2001; Zero, 2004).

Dieta cariogênica é o substrato, ou seja, a matéria-prima fornecida pelo próprio hospedeiro, necessária para que os microrganismos cariogênicos consigam desenvolver-se sobre os dentes, sintetizar polissacarídeos de reserva, produzir ácidos orgânicos que promovem a desmineralização do esmalte dentário e conseqüentemente, a lesão de cárie (De Lorenzo, 1998; De Lorenzo; De Lorenzo, 2002).

A cariogenicidade da dieta é determinada pela presença de carboidratos fermentáveis, principalmente a sacarose (Sreebny, 1982; Burt et al., 1988; Manji; Fejerskov, 1990).

É importante considerar que a desmineralização que ocorre após a ingestão de qualquer dieta cariogênica se dá durante um determinado tempo, até que a capacidade tampão e ação remineralizadora da saliva paralise o processo, não determinando uma lesão de cárie e sim uma simples desmineralização reversível (Lima, 2007).

Mas, com a ingestão sistemática e cada vez mais freqüente de alimentos cariogênicos pelo ser humano, produzindo um desequilíbrio crescente da desmineralização-remineralização, a cárie estabeleceu-se na população mundial de uma forma endêmica, levando-se a concluir que a dieta seria um fator determinante da doença (Lima, 2007).

Na avaliação do risco de cárie, um importante componente a ser determinado pela anamnese é o potencial cariogênico da dieta do paciente e a freqüência com que esses alimentos são utilizados diariamente (Lorenzo; Lorenzo, 2004).

Os principais fatores de cariogenicidade inerentes aos alimentos consumidos são: tipo de carboidrato, quantidade e concentração de carboidratos fermentáveis, resistência oferecida à mastigação. Além desses fatores próprios dos alimentos consumidos, devemos levar em consideração importantes fatores relacionados com o hospedeiro: tempo necessário para a remoção do carboidrato e freqüência de ingestão de carboidratos (Theilade; Birkhed, 1988).

Segundo Fontana e Zero (2006), estudos epidemiológicos têm demonstrado uma positiva e forte relação entre experiência passada de cárie e o possível desenvolvimento de novas lesões. Este único indicador de risco de cárie fornece uma importante capacidade preditiva (Disney et al., 1992; Zero et al., 2001).

A presença de cáries em mães aumenta o risco de cáries em seus filhos. A presença de cárie na dentição decídua pode ser um futuro preditivo de presença de cárie na dentição permanente. Em

adultos, há uma associação entre presença de cáries e desenvolvimento de cárie radicular (DePaola et al., 1989; Helm; Helm, 1990; Li; Wang, 2002).

O amplo uso do fluoreto tem reduzido a prevalência de cárie e a taxa de progressão das lesões cariosas drasticamente. O uso do fluoreto, que pode ser considerado um dos mais importantes fatores protetores quando se avalia o risco de cárie de um paciente, permite um gerenciamento mais conservativo nas estratégias para a prevenção e tratamento da cárie dentária (Fontana; Zero, 2006).

### 2.2.2 Risco de cárie

Risco de cárie determina a probabilidade da incidência de cárie (número de novas cavidades ou lesões incipientes) em um certo período. Também envolve a probabilidade de haver mudanças no tamanho ou atividade das lesões na boca (Disney et al., 1992).

Segundo Mayer e Lorenzo (2004) os fatores indicadores de risco de cárie que devem ser objetos de análise são: condição socioeconômica, doenças e outras condições que interferem na incidência de cárie dentária (alterando a formação, o fluxo e a composição da saliva ou alterando o padrão da dieta), ingestão de medicamentos que influem no processo de cárie, deficiências motoras que dificultam a higiene bucal, regurgitações ácidas e gravidez, uso de fluoretos, análise da dieta, análise da experiência anterior de cárie, qualidade da higiene bucal, função salivar, análise microbiológica.

### 2.2.3 Estreptococos do grupo *mutans*

Após a descoberta por Clarke em 1924, *S. mutans* permaneceu por aproximadamente 35 anos praticamente ignorado, até 1960 com os estudos de Fitzgerald e Keyes. A partir daí a sua correlação com a doença cárie tem sido extensivamente estudada, indicando ser esta bactéria o principal agente etiológico da cárie de superfícies lisas (Leites et al., 2006).

São cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, microaerófilos, acidogênicos e acidúricos, e capazes de formar polissacarídeos extracelulares (Leites et al., 2006).

Em 1986, considerando-se diferenças de virulência e características de sorotipagem, a espécie *S. mutans* foi reclassificada em sete espécies (*S. cricetus*, *S. downei*, *S. ferus*, *S. macacae*, *S. mutans*, *S. rattus* e *S. sobrinus*), constituindo os estreptococos do grupo *mutans* (Koga-Ito; Jorge, 2007).

*S. mutans* e *S. sobrinus* são isolados a partir das superfícies dentárias e lesões de cárie em seres humanos e apresentam potencial cariogênico em humanos. As demais espécies do grupo *mutans* são encontradas na cavidade bucal de animais e, se estão presentes em humanos, não parecem ser altamente cariogênicas (Leites et al., 2006; Koga-Ito; Jorge, 2007).

Os EGM são um grupo de microrganismos altamente cariogênicos pelas seguintes características: capacidade de colonizar a superfície dentária: Essas bactérias colonizam superfícies que não descamam (dentes, materiais restauradores, acrílicos). Produzir polissacarídeos extracelulares do tipo glicano (dextrana e mutano) a partir da sacarose, o que favorece a formação de biofilme dentário espesso (Leites et al., 2006). Capacidade acidogênica: a produção de ácido láctico (ácido orgânico forte) é determinante fundamental para a patogenicidade,

sendo responsável pela desmineralização do esmalte dentário na etapa inicial da cárie. É capaz de fazer o pH ambiental declinar para aproximadamente 4,0, mais ácido que o pH crítico para a desmineralização do esmalte dentário (cerca de 5,5). É um pré-requisito essencial para que um microrganismo seja considerado cariogênico (Lorenzo; Lorenzo, 2004). Capacidade acidúrica: sobrevivência do microrganismo em pH ácido, permitindo que o microrganismo desenvolva suas atividades metabólicas em ambientes de pH baixo, tais como sulcos e fissuras dos dentes (Leites et al., 2006; Koga-Ito; Jorge, 2007). Acúmulo de polissacarídeos intracelulares de glicose do tipo amilopectina a partir de carboidratos da dieta do hospedeiro. Esses polímeros são metabolizados quando os açúcares exógenos estão esgotados, resultando na formação de ácido láctico. Além disso, os EGM são fermentadores de grande quantidade de carboidratos, incluindo manitol e sorbitol (Leites et al., 2006).

Segundo revisão realizada por Leites et al. (2006), os estudos apontam que: os EGM são cariogênicos em animais e humanos, a maioria dos indivíduos com alta prevalência de cárie têm alta contagem de EGM, poucos indivíduos com baixa contagem de EGM têm alta prevalência de carie, os níveis de EGM não implicam automaticamente em um certo nível de cárie dentária, pois a cárie é uma doença multifatorial, na qual vários fatores desempenham papel importante.

#### 2.2.4 Lactobacilos

Os lactobacilos são bastonetes Gram-positivos, não-esporulados, que em geral crescem melhor sobre condições de microaerofilia e em pH ácido (5,4) (Rogosa et al., 1951).

Os lactobacilos representam cerca de 1% da microbiota bucal, sendo as espécies *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus fermentum* as mais comuns. *Lactobacillus acidophilus* é mais encontrado na saliva, enquanto *L. casei* predomina no biofilme dentário e dentina cariada. Os lactobacilos podem ser isolados da saliva, superfície dentária, dorso da língua, mucosa vestibular e palato duro (Koga-Ito; Jorge, 2007). Os lactobacilos são conhecidos por serem produtores de ácido láctico com excepcional tolerância ácida (Klinke et al., 2009).

Historicamente, os lactobacilos foram os primeiros microrganismos relacionados com o desenvolvimento da cárie (Owen, 1949). Atualmente se considera que não são iniciadores, mas sim envolvidos na progressão do processo carioso (Beighton; Brailsford, 1998; Koga-Ito; Jorge, 2007). Além disso, estão diretamente correlacionados com a alta e freqüente ingestão de carboidratos. Assim, a contagem de lactobacilos pode ser usada tanto para avaliação do risco de cárie como para avaliar o efeito das alterações dietéticas (Mayer; Lorenzo, 2004; Koga-Ito; Jorge, 2007). Alguns trabalhos na literatura demonstraram correlação entre altas contagens desse microrganismo e atividade clínica de cárie (Koga-Ito; Jorge, 2007).

Indivíduos com baixa concentração de lactobacilos na saliva usualmente desenvolvem novas lesões de cárie, entretanto, indivíduos com altas contagens são mais suscetíveis a desenvolver a doença (Rego; Jorge, 2007).

### 2.2.5 Leveduras

A presença desses microrganismos em processos cariogênicos e canais radiculares humanos foi avaliada por Passos (1961) e Bertolini (1964). Bartels e Blechman (1962) e Davenport (1970)

ressaltaram a frequência e distribuição de leveduras na cavidade bucal de indivíduos normais, ou de usuários de próteses dentárias.

Fosdick e Hansen (1937) foram uns dos primeiros a sugerir a correlação entre leveduras e produção de ácidos na cavidade bucal. Os autores chegaram a essa conclusão através da incubação *in vitro* de esmalte dentário em saliva. Os autores observaram que quando a saliva continha somente *L. acidophilus*, o esmalte dentário não era dissolvido, porém, quando leveduras isoladas da cavidade bucal eram adicionadas, a produção de ácido era suficiente para dissolver o esmalte dentário.

A associação entre contagem de leveduras com atividade de cárie foi discutida por Glass (1985), Pienihäkkinen (1987) e Russel et al. (1991), demonstrando o aparecimento de espécies de *Candida* na cárie e estruturas ao redor. Esses autores, a fim de avaliar a correlação entre leveduras e risco de cárie, constataram uma elevada frequência de *Candida* nas lesões de cárie, sugerindo que as lesões de cárie funcionam como um reservatório de leveduras.

Em adição aos EGM e lactobacilos, *Candida albicans* também é fortemente associada com cárie em crianças, adolescentes e adultos jovens (Gabris et al., 1999; Moalic et al., 2001; Beighton et al., 2004).

Embora *C. albicans* tenha sido isolada de lesões de cárie em dentina de crianças, em altas frequências, variado de 71 a 97% (Marchant et al., 2001; Sziegoleit et al., 2002; de Carvalho et al., 2006), ainda não se sabe como a levedura age como um patógeno cariogênico ou faz papel de microrganismo comensal. Entretanto, *C. albicans* possui um largo espectro de propriedades cariogênicas: é capaz de aderir a hidroxiapatita coberta por saliva (Cannon et al., 1995) e apresenta forte aderência ao colágeno (Makihiro et al., 2002). Demonstrando extrema tolerância ácida, a levedura provou reduzir o pH da saliva suplementada

com glicose, para valores abaixo de 3,2 através da secreção de ácidos orgânicos (Samaranayake et al., 1986).

#### 2.2.6 Saliva

A saliva é um fluido exócrino que consiste em aproximadamente 99% de água, contendo uma variedade de eletrólitos (sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato, fosfato) e proteínas, representadas por enzimas (lisozima, lactoferrina, peroxidase, sialoperoxidase), imunoglobulinas e outros fatores antimicrobianos, glicoproteínas, traços de albumina e um pouco de polipeptídeos e oligopeptídeos de importância para a saúde bucal. Também há uréia e amônia e todos esses componentes interagem, e são responsáveis por várias funções atribuídas a saliva (Edgar, 1992; Humphrey; Williamson, 2001; Berkovitz et al., 2002).

Em uma pessoa normal a média diária de secreção de saliva varia de 1 a 1,5 L. O índice de fluxo salivar é um parâmetro que permite que o fluxo salivar estimulado ou não, seja classificado em: normal, baixo ou muito baixo (hipossalivação) (Humphrey; Williamson, 2001).

A saliva é um componente crítico para a preservação e manutenção da saúde bucal e tem sido usada como uma fonte de investigação não invasiva do metabolismo e eliminação de muitas drogas. Entretanto, ela recebe pouca atenção até que sua quantidade diminua ou sua qualidade se altere (Tabak, 2001).

Está bem estabelecido que a saliva desenvolve um papel importante na saúde dos tecidos moles e duros da cavidade bucal. Problemas bucais resultantes da hipofunção das glândulas salivares incluem: alteração da sensibilidade bucal, alteração da gustação, secura

da mucosa bucal que pode resultar em infecção e desgaste dentário devido à abrasão (Fox et al., 1985; Navazesh, 1994).

O fluxo salivar baixo, quando crônico, é um dos fortes indicadores salivares para um incremento no risco de desenvolvimento de cáries (Leone; Oppenheim, 2001).

A saliva se comporta como um sistema tamponante para proteger a cavidade bucal: prevenindo a colonização por microrganismos potencialmente infectantes através de alterações das condições ambientais; a saliva tampona (neutraliza) os ácidos produzidos por microrganismos acidogênicos, prevenindo assim a desmineralização do esmalte dentário (Nagler, 2004).

A sialina, peptídeo salivar, desempenha um importante papel no aumento do pH do biofilme dentário após a exposição a carboidratos fermentáveis (Ten Cate, 1998).

A uréia é outro tampão presente na saliva que é resultante do catabolismo de aminoácidos e proteínas e causa um rápido aumento no pH do biofilme dentário pela liberação de amônia e dióxido de carbono quando hidrolisada por urease bacteriana (Ertugrul et al., 2003). Crianças com insuficiência renal crônica apresentam menos cáries do que crianças saudáveis devido ao aumento dos níveis de urease na saliva (Lucas; Roberts, 2005).

O sistema ácido carbônico/bicarbonato é o mais importante tampão presente na saliva estimulada, enquanto na saliva não estimulada prevalece o sistema tampão fosfato (Tenovuo; Lagerlöf, 1994).

A saliva de indivíduos cujas bocas contêm um número considerável de lesões cariosas freqüentemente apresenta capacidade tampão mais baixa do que a saliva daqueles que são relativamente livres de cáries (Rego; Jorge, 2007).

Os testes salivares mais freqüentemente usados para fins clínicos em Cariologia são: fluxo salivar estimulado ou não, capacidade tampão e contagem de unidades formadoras de colônias de

microrganismos, na maioria dos casos EGM, lactobacilos e leveduras (Farsi, 2008).

### 3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral do estudo foi investigar a microbiota cariogênica, fluxo salivar e capacidade tampão salivar de pacientes pediátricos com anemia falciforme.

Os objetivos específicos para este estudo foram:

- a) reunir os dados microbiológicos, salivares, dados obtidos no exame clínico e questionário para traçar um perfil de risco de cárie;
- b) avaliar se a referida doença e/ou sua terapia influenciam na presença de espécies do gênero *Candida*.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos éticos**

O estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos, seguindo as diretrizes e normas que regulamentam a pesquisa envolvendo seres humanos, conforme as resoluções 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde. Os procedimentos realizados não trouxeram dor, desconforto ou risco de espécie alguma ao paciente, cujo responsável foi conscientizado do intuito da pesquisa e deu seu consentimento livre e esclarecido mediante a assinatura em formulário próprio (Apêndices A e C). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP sob o protocolo 082/2007-PH/CEP (Anexos A e B), e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo – UNIFESP sob o protocolo 1735/07 (Anexo C).

### **4.2 Critérios de inclusão**

Foram incluídos no presente estudo 25 pacientes de ambos os gêneros, com idades entre 4 a 11 anos com anemia falciforme (genótipo SS), diagnosticadas clinicamente e por métodos laboratoriais e em tratamento no ambulatório de Hematologia Pediátrica do Hospital São Paulo (Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP). As crianças deveriam estar sob antibioticoterapia com

penicilina por um período mínimo de 6 meses (12 crianças sob profilaxia com Benzetacil e 13 sob profilaxia com Pen-Ve-Oral).

Para o grupo controle foram selecionadas 25 crianças com perfil semelhante (gênero, idade [ $\pm$  2 anos] e condições bucais) ao grupo de estudo, dentre os indivíduos atendidos na clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, sem diagnóstico de anemia falciforme ou outras doenças sistêmicas e que não tenha sido submetido a tratamento com antibióticos ou antifúngicos nos últimos 60 dias.

#### **4.3 Critérios de exclusão**

Foram excluídos do estudo pacientes diabéticos não metabolicamente controlados, pacientes usuários de aparelhos ortodônticos e/ou chupetas, usuários de medicamentos antidepressivos e que apresentavam lesões sugestivas de candidose bucal.

#### **4.4 Anamnese e exame clínico**

Foram avaliados durante a realização da anamnese os dados pessoais, as condições de saúde geral e bucal de todos os indivíduos. Foram também coletados dados sobre a frequência de ingestão de carboidratos fermentáveis pelos pacientes e realizado exame intrabucal (com auxílio de espátula de madeira e luz natural), pelo mesmo examinador para avaliar o índice de dentes cariados, perdidos ou obturados (ceo-d/CPO-D) e a presença de lesões bucais (Apêndice B). Dados específicos sobre a história médica (diagnóstico, duração da

doença, terapia) foram obtidos com o médico responsável, a partir do prontuário do paciente.

#### **4.5 Coleta das amostras**

A saliva total dos pacientes foi coletada em cálices graduados e esterilizados, através da estimulação do fluxo salivar pela mastigação de um pedaço de filme plástico (Parafilm) de 5x5 cm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, EUA), durante 5 minutos, descartando a primeira porção.

#### **4.6 Processamento das amostras**

##### **4.6.1 Determinação do fluxo salivar**

A determinação do fluxo salivar foi realizada de acordo com Krasse (1986), obtendo-se valores em mililitro de saliva por minuto (mL/min). Os resultados foram classificados como: normal (maior que 1 mL/min), fluxo salivar reduzido (menor que 0,7 mL/min) e xerostomia (valores menores que 0,1 mL/min).

#### 4.6.2 Determinação da capacidade tampão da saliva

A capacidade tampão da saliva foi avaliada de acordo com Ericsson (1959) através da adição de 1 mL de saliva em 3 mL de ácido clorídrico 0,005 N, que foi agitado e deixado em repouso, em recipiente aberto, durante 10 minutos para a eliminação do CO<sub>2</sub>, e em seguida o pH final foi medido por um pHmetro digital portátil (HI 8314, Hanna Instruments, Mauritius) e os resultados foram classificados como: normal (pH entre 5,0 e 7,0), valores limítrofes (pH entre 4,0 e 5,0) e baixa capacidade tampão (pH menor que 4,0).

Os recipientes contendo as amostras saliva foram mantidos em uma bolsa térmica com gelo até serem transportados para o laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, onde finalizou-se o processamento, respeitando-se o período máximo de 4 horas, a partir da coleta.

As amostras de saliva foram diluídas a 10<sup>-1</sup> e 10<sup>-2</sup> em solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,9%) para a realização dos testes seguintes.

#### 4.6.3 Contagem de estreptococos do grupo *mutans*

Saliva pura e suas diluições (100 µL de cada) foram semeadas em duplicata em ágar Mitis Salivarius (Himedia, Mumbai, India) acrescido de bacitracina (0,2 UI/mL) e 15% de sacarose, e incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 72 h. Após este período, as colônias características de estreptococos do grupo *mutans* foram contadas. Contagens acima de

1000000 UFC/mL foram correlacionadas com alto risco à cárie e abaixo de 100000 UFC/mL foram correlacionadas com baixo risco à cárie. (Khöler; Bratthall, 1979)

#### 4.6.4 Contagem de lactobacilos

Saliva pura e suas diluições (100 µL de cada) foram semeadas (*pour plate*) em duplicata em ágar Rogosa SL (Himedia, Mumbai, India) acrescido de ácido acético glacial (1,32 µL/mL) e incubadas por 72 h a 37°C em condições de aerobiose. As contagens de lactobacilos foram classificadas em relação à atividade de cárie como segue: atividade de cárie negativa (0 a 1000 UFC/mL de saliva), baixa atividade de cárie (1000 a 5000 UFC/mL), atividade de cárie moderada (5000 a 10000 UFC/mL) e alta atividade de cárie (> 10000 UFC/mL). (Cortelli et al., 2002)

#### 4.6.5 Contagem de leveduras

Saliva pura e suas diluições (100 µL de cada) foram semeadas em duplicata em ágar Sabouraud dextrose (Himedia, Mumbai, India) acrescido de cloranfenicol (0,1 mg/mL) e incubadas por 48 h a 37°C sob condições de aerobiose. Após esse período, as placas na qual não foi verificado crescimento de colônias de leveduras foram deixadas por mais 5 dias em temperatura ambiente. Os resultados foram classificados de acordo com Pienihäkkinen (1988): atividade de cárie negativa (0 UFC/mL), baixa atividade de cárie (0 a 100 UFC/mL), atividade de cárie moderada (100 a 400 UFC/mL) e alta atividade de cárie (> 400 UFC/mL).

#### **4.7 Isolamento e obtenção de culturas puras**

A partir das colônias que cresceram nas placas de ágar Sabouraud dextrose cloranfenicol, foram selecionadas 4 colônias de morfologias diferentes de cada paciente. A partir destas, foram obtidos esfregaços que após procedimento de coloração pelo método de Gram, foram observados em microscópio para confirmação da morfologia.

Para obtenção de culturas puras, após a confirmação microscópica, as colônias foram transferidas para ágar Sabouraud dextrose em tubo inclinado e incubadas por 24 h a 37 °C, sendo armazenadas a 4 °C para posterior identificação.

#### **4.8 Identificação dos isolados de leveduras**

As culturas obtidas foram repicadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas por 24 h a 37°C. Para a identificação das espécies foi utilizado o sistema API 20 C AUX (Biomérieux, França), de acordo com as instruções do fabricante.

Foi preparada uma suspensão em 2 mL de solução salina esterilizada (NaCl 0,85%), padronizada na escala 2 de McFarland (Biomérieux, França) e em seguida, 100 µL da suspensão foi adicionada ao meio de cultura API C Medium. Posteriormente, os poços do sistema de identificação foram preenchidos pelo meio de cultura API C Medium acrescido do microrganismo, para cada amostra a ser identificada.

Em seguida, o sistema foi incubado a 30 °C e a leitura realizada em duas etapas: a primeira após 48 h e a segunda após 72 h de incubação. A leitura dos testes foi realizada de acordo com o manual do kit e os resultados foram anotados em formulário próprio. Os resultados

apresentados resultaram em um código numérico que foi inserido no programa APIWEB que retorna a espécie correspondente, sendo adotado como porcentagem aceitável de identificação um valor acima de 80%.

#### 4.8.1 Identificação genotípica de *Candida dubliniensis*

Para a identificação definitiva de *C. dubliniensis*, as amostras previamente identificadas como *C. dubliniensis* foram submetidas à PCR, de acordo com a metodologia proposta por Donnelly et al. (1999) e Mähns et al. (2005).

Os isolados foram inicialmente repicados em ágar Sabouraud dextrose e incubados por 24 horas a 37 °C. A seguir, uma pequena porção de cada crescimento foi coletada, com o auxílio de uma ponteira esterilizada (capacidade de 20-200 µL), e foi transferida para um tubo plástico (*Eppendorf*) contendo 75 µL de água destilada esterilizada. Os tubos foram submetidos a um pulso em centrífuga a 10.000 rpm para que todo material fosse retirado das paredes do tubo. Em seguida, os tubos foram mantidos em banho-maria a 95 °C por 10 minutos para a extração do DNA das amostras. Decorrido este período, as amostras foram novamente centrifugadas a 15.000 rpm por 15 minutos, e armazenadas em freezer a -20 °C.

Para a PCR foram utilizados dois pares de iniciadores (*primers*), sendo o primeiro par os iniciadores universais Uni-f: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA-3' e o Uni-r: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG-3'; e o segundo par os iniciadores específicos para *C. dubliniensis*, DUBF Act-f: 5'-GTATTTGTCGTTCCCCTTTC-3' e DUBR Act-r: 5'-GTGTTGTGTGCACTAACGTC-3'. A amplificação foi realizada em ciclador Eppendorf Master com 50 µL de volume final. Nesta amostra

tínhamos 5 µL de DNA molde da amostra lisada, 1µL de cada iniciador (*primer*), 1 µL dos desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 5 µL de tampão (10 mM Tris HCl pH 8,5; 50 mM KCl), 0,2 µL de Taq DNA polimerase, 1,5 µL de magnésio e 33,3 µL de água desmineralizada esterilizada. Um protocolo *hot start* foi utilizado: (95 °C por 3 min) seguido por 30 ciclos (95 °C por 30 s, 58 °C por 30 s e 72 °C por 60 s) e extensão final (72 °C por 10 min).

Uma alíquota da reação de PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1% (110 V por 20 min). Os fragmentos universais têm aproximadamente 614 pares de bases (pb), sendo, portanto visualizadas as bandas em todas as espécies. O par de *primers* específicos para *C. dubliniensis* apresentam fragmentos de 288 pb, resultando em uma segunda banda visível para esta espécie.

Foram utilizadas amostras de *C. albicans* (ATCC 18804) e *C. dubliniensis* (NCFP 3108) como controles da reação.

#### 4.9 Determinação do risco de cárie

Os dados obtidos através da ficha clínica, resultados dos testes salivares e microbiológicos foram avaliados através da versão brasileira do software Cariograma 1.0. (Buischi, 2000) Os parâmetros país/área e grupo foram mantidos fixos em “amostra padrão”. As correlações entre os escores dos parâmetros avaliados pelo software são listadas no quadro 2.

Quadro 2 – Escores do software Cariograma (continua)

| Parâmetros           | Escore | Descrição                      | Correlação                      |
|----------------------|--------|--------------------------------|---------------------------------|
| Experiência de cárie | 0      | livre de cáries                | ceo-d + CPO-D = 0               |
|                      | 1      | melhor que o normal            | ceo-d + CPO-D entre 1 e 2       |
|                      | 2      | normal para a faixa etária     | ceo-d + CPO-D entre 3 e 4       |
|                      | 3      | pior que o normal              | ceo-d + CPO-D maior que 4       |
| Doenças relacionadas | 0      | sem doença                     | fixado no escore 2              |
|                      | 1      | doença, grau leve              |                                 |
|                      | 2      | doença, grau severo            |                                 |
| Dieta, conteúdo      | 0      | ingestão muito baixa de açúcar | 0 - 1000 UFC/mL de lactobacilos |
|                      | 1      | baixa ingestão                 | 1000 - 5000 UFC/mL              |
|                      | 2      | ingestão moderada              | 5000 - 10000 UFC/mL             |
|                      | 3      | alta ingestão                  | maior que 10000 UFC/mL          |
| Dieta, frequência    | 0      | máximo três vezes ao dia       | incluindo entre as refeições    |
|                      | 1      | máximo cinco vezes ao dia      |                                 |
|                      | 2      | máximo sete vezes ao dia       |                                 |
|                      | 3      | mais de sete vezes ao dia      |                                 |
| Quantidade de placa  | 0      | índice de placa = 0            | não foi considerado             |
|                      | 1      | índice de placa = 1            |                                 |
|                      | 2      | índice de placa = 2            |                                 |
|                      | 3      | índice de placa = 3            |                                 |

Quadro 2 – Escores do software Cariograma (continuação)

|                                      |   |                                           |                               |
|--------------------------------------|---|-------------------------------------------|-------------------------------|
| Estreptococos do grupo <i>mutans</i> | 0 | Strip <i>mutans</i> classe 0              | 0 UFC/mL                      |
|                                      | 1 | Strip <i>mutans</i> classe 1              | menor que 100000 UFC/mL       |
|                                      | 2 | Strip <i>mutans</i> classe 2              | entre 100000 e 1000000 UFC/mL |
|                                      | 3 | Strip <i>mutans</i> classe 3              | maior que 1000000 UFC/mL      |
| Programa de flúor                    | 0 | programa máximo de flúor                  | fixado no escore 2            |
|                                      | 1 | meios adicionais de flúor, ocasionalmente |                               |
|                                      | 2 | dentifrício fluoretado, sem suplementos   |                               |
|                                      | 3 | não utiliza flúor                         |                               |
| Secreção salivar                     | 0 | secreção salivar normal                   | -                             |
|                                      | 1 | secreção entre 0,9 e 1,1 mL/min           | -                             |
|                                      | 2 | secreção entre 0,5 e 0,9 mL/min           | -                             |
|                                      | 3 | secreção menor que 0,5 mL/min             | -                             |
| Capacidade tampão                    | 0 | adequada, cor azul do Dentobuff           | maior que 5                   |
|                                      | 1 | reduzida, cor verde do Dentobuff          | entre 4 e 5                   |
|                                      | 2 | baixa, cor amarela do Dentobuff           | menor que 4                   |

Quadro 2 – Escores do software Cariograma (conclusão)

|                   |   |                                            |                    |
|-------------------|---|--------------------------------------------|--------------------|
| Avaliação clínica | 0 | melhor do que a indicada pelos dados acima | fixado no escore 1 |
|                   | 1 | normal, de acordo com os dados acima       |                    |
|                   | 2 | risco aumentado, comparado aos dados acima |                    |
|                   | 3 | risco muito alto                           |                    |

#### 4.10 Análise dos resultados

Os resultados foram analisados e comparados entre os grupo em estudo, através do teste t de Student (fluxo salivar, capacidade tampão), Mann-Whitney (contagem de microrganismos, índices ceo-d e CPO-D) e teste Z (risco de cárie), através do software estatístico Minitab 15, todos com nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise dos dados da ficha clínica

Com relação ao gênero, participaram do estudo 13 meninas (52%) e 12 meninos (48%) em ambos os grupos (anemia e controle). Para o grupo de estudo a idade dos pacientes variou entre 4 e 11 anos, com média de 8,8 anos. No grupo de estudo participaram 01 crianças de 4 anos, 02 de 5 anos, 01 de 6 anos, 02 de 7 anos, 04 de 8 anos, 04 de 9 anos, 03 de 10 anos e 08 de 11 anos (Figura 1).

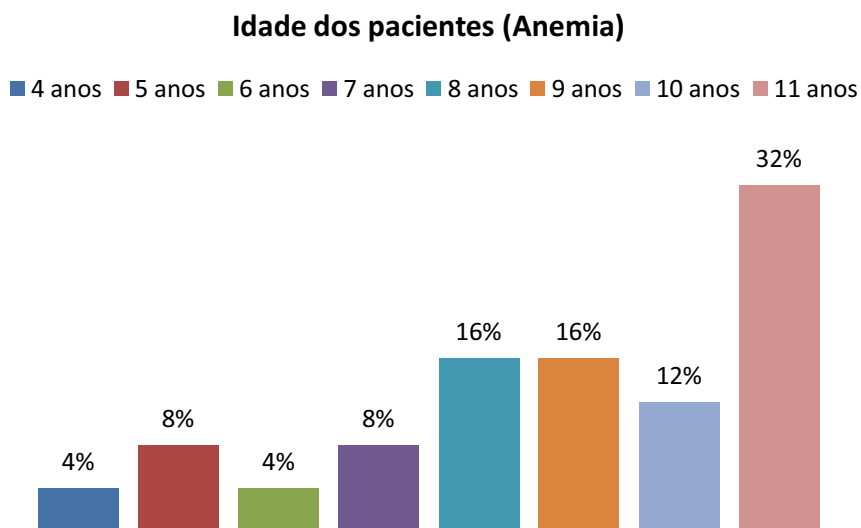


Figura 1 – Distribuição dos pacientes do grupo de estudo de acordo com a idade.

Para o grupo controle, a idade dos pacientes variou entre 6 e 11 anos com média de 8,68 anos. Participaram do estudo 02 crianças

de 6 anos, 03 de 7 anos, 10 de 8 anos, 01 de 9 anos, 04 de 10 anos e 05 de 11 anos (Figura 2).

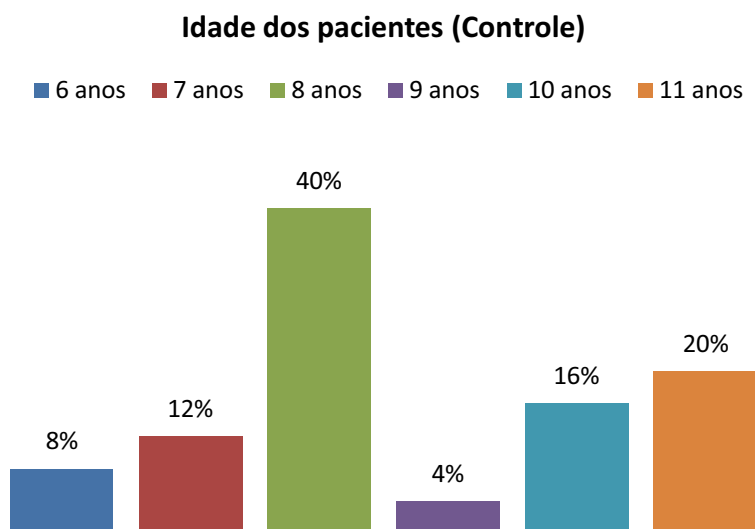


Figura 2 – Distribuição dos pacientes do grupo controle de acordo com a idade.

Com relação à escolaridade dos pais, no grupo de estudo, 06 pais tinham o ensino fundamental completo (EFC), 11 tinham o ensino fundamental incompleto (EFI), 05 tinham o ensino médio completo (EMC). Em 03 casos, o acompanhante responsável pelo paciente não sabia informar a escolaridade do pai da criança. Para o grupo controle, 02 pais tinham o EFC, 07 tinham o EFI, 06 tinham o EMC, 05 tinham o ensino superior completo (ESC), 01 tinha o ensino superior incompleto (ESI). Em 04 casos, o acompanhante responsável pelo paciente não sabia informar a escolaridade do pai da criança. Para ambos os grupos, nenhum dos pais tinham o ensino médio incompleto (EMI) (Figura 3).

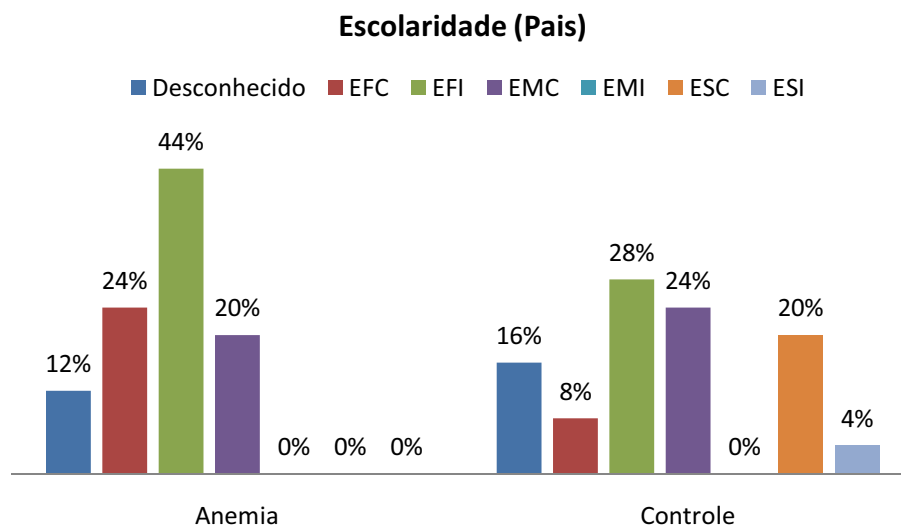


Figura 3 – Escolaridades dos pais.

Com relação à escolaridade das mães, no grupo de estudo, 03 tinham o EFC, 11 tinham o EFI, 08 tinham o EMC, 02 tinham o EMI e 01 tinha o ESC. Para o grupo controle, 02 tinham EFC, 03 tinham o EFI, 10 tinham o EMC, 01 tinham o EMI e 06 tinham o ESC. Em 03 casos, o acompanhante responsável pelo paciente não sabia informar a escolaridade da mãe da criança (Figura 4).

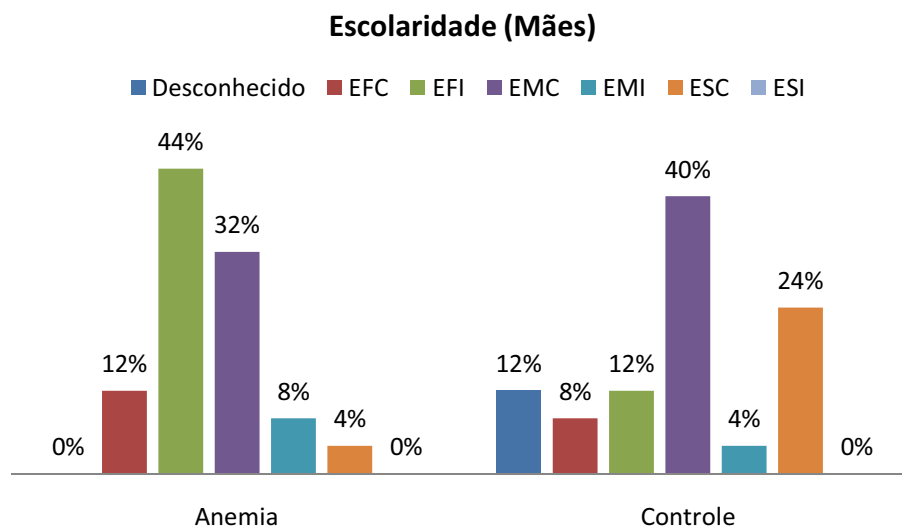


Figura 4 – Escolaridade das mães.

No grupo de estudo, com relação à história médica:

- a) todas as crianças estavam sob uso de ácido fólico;
- b) 01 criança estava sob uso de albendazol e 01 sob uso de leite de magnésia;
- c) 12 crianças (48%) estavam sob uso de Benzetacil e 13 (52%) estavam sob uso de Pen-Ve-Oral;
- d) outras informações sobre a saúde dos pacientes: 01 paciente com sopro, 01 paciente com sopro e alteração hepática, 01 paciente com não tinha a vesícula e um rim e 01 paciente com osteoporose.

Com relação à história dentária:

- a) 06 crianças (24%) nunca visitaram um dentista;
- b) 02 crianças (8%) não costumam fazer refeições regulares (café da manhã, almoço e jantar);
- c) 21 crianças (84%) costumam ingerir alimentos entre as principais refeições;
- d) principais alimentos ingeridos entre as refeições: balas, bolachas, bolachas recheadas, cereais, chicletes, doces, frutas, iogurtes, pães, salgadinhos, salgados, sucos;
- e) todas as crianças afirmaram escovar os dentes;
- f) alterações bucais: foi encontrado 01 criança com fluorose e pólipos pulpar.

No grupo controle, com relação a história médica:

- a) 03 pacientes estavam sob uso de corticóides inalados, 01 estava sob uso de Gardenal, 01 estava sob uso de Bromexina e 01 estava sob uso de anti-histamínico e Profenid;
- b) outras informações sobre a saúde dos pacientes: 01 criança com bronquite.

Com relação à história dentária:

- a) 02 crianças (8%) não costumam fazer refeições regulares;
- b) todas afirmaram ingerir alimentos entre as principais refeições;

- c) principais alimentos ingeridos entre as refeições: balas, biscoitos, bolachas, bolos, cereais, chicletes, doces, frios, frutas, iogurtes, leite, ovos, pães, refrigerante, salgadinhos, sucos;
- d) todas as crianças afirmaram escovar os dentes;
- e) alterações bucais: 01 criança com hiperplasia gengival e 01 criança com reabsorção dentária interna.

Com relação à ingestão de doces e guloseimas, no grupo de estudo, 02 crianças disseram não ingerir doces e similares, 11 ingeriam 01 vez ao dia, 06 ingeriam 02 vezes ao dia, 02 ingeriam 03 vezes ao dia, 03 ingeriam 04 vezes ao dia e 01 ingeria doces e similares 06 vezes ao dia. Para o grupo controle, 03 crianças disseram não ingerir doces e similares, 15 ingeriam 01 vez ao dia, 05 ingeriam 02 vezes ao dia e 02 disseram ingerir doces e similares 03 vezes ao dia (Figura 5).

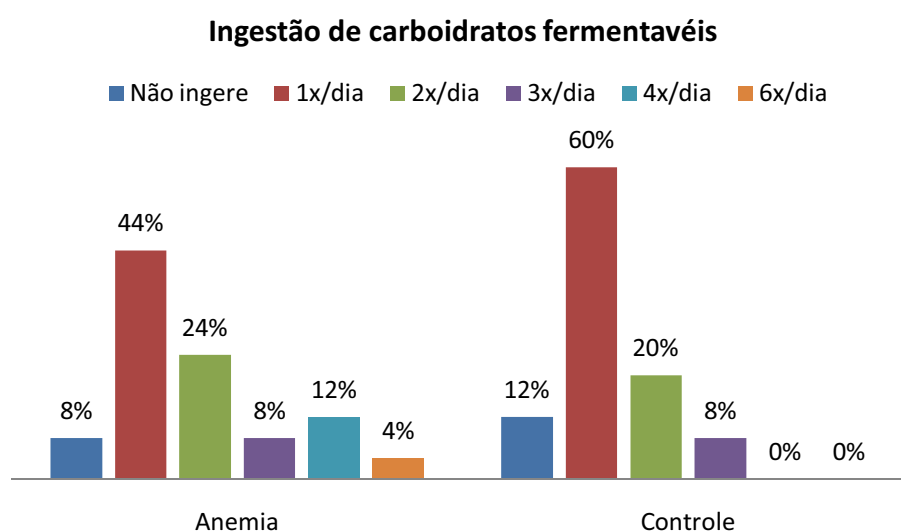


Figura 5 – Distribuição da frequência de ingestão de doces nos grupos em estudo.

Com relação à frequência de escovação, para o grupo de estudo, 06 crianças disseram escovar os dentes 01 vez ao dia, 05 escovavam 02 vezes ao dia, 12 escovavam 03 vezes ao dia e 02 escovavam 04 vezes ao dia. No grupo controle, 01 criança disse escovar os dentes 01 vez ao dia, 06 crianças escovavam 02 vezes ao dia, 16 crianças escovavam 03 vezes ao dia e 02 escovavam 04 vezes ao dia (Figura 6).

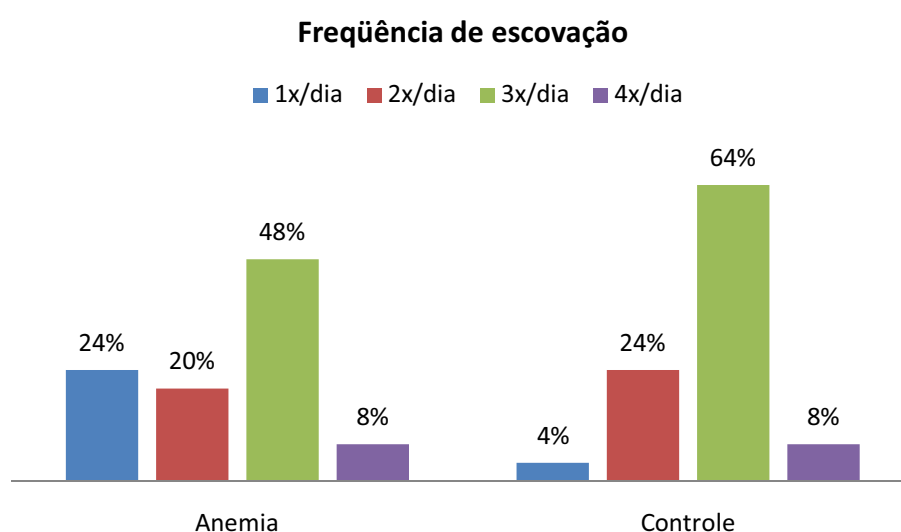


Figura 6 – Distribuição da frequência de escovação nos grupos em estudo.

A análise dos valores dos índices ceo-d e CPO-D estão representados a seguir:

Tabela 1 – Análise descritiva dos valores do índice ceo-d

|          | N  | Mediana | Média | DP   | Mínimo | Máximo |
|----------|----|---------|-------|------|--------|--------|
| Anemia   | 25 | 0       | 1,44  | 1,96 | 0      | 7      |
| Controle | 25 | 1       | 2,36  | 3,09 | 0      | 12     |

N = número de pacientes; DP = desvio padrão; p = 0,3086.

Tabela 2 – Análise descritiva dos valores do índice CPO-D

|          | N  | Mediana | Média | DP   | Mínimo | Máximo |
|----------|----|---------|-------|------|--------|--------|
| Anemia   | 25 | 2       | 2,00  | 1,85 | 0      | 6      |
| Controle | 25 | 1       | 1,32  | 1,52 | 0      | 4      |

N = número de pacientes; DP = desvio padrão; p = 0,2159.

Quando comparados estatisticamente, não foi verificada diferença significativa entre os grupos em estudo, tanto para o ceo-d ( $p = 0,3086$ ) quanto para o CPO-D ( $p = 0,2159$ ).

As figuras a seguir representam a distribuição dos valores dos índices ceo-d e CPO-D entre os grupos anemia e controle (Figuras 7 e 8).

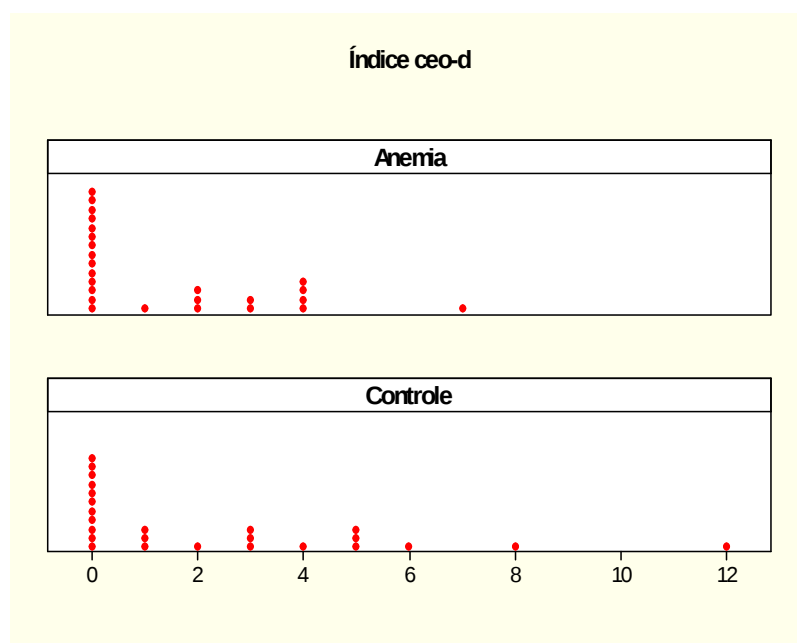


Figura 7 – Distribuição dos valores do índice ceo-d nos grupos em estudo.

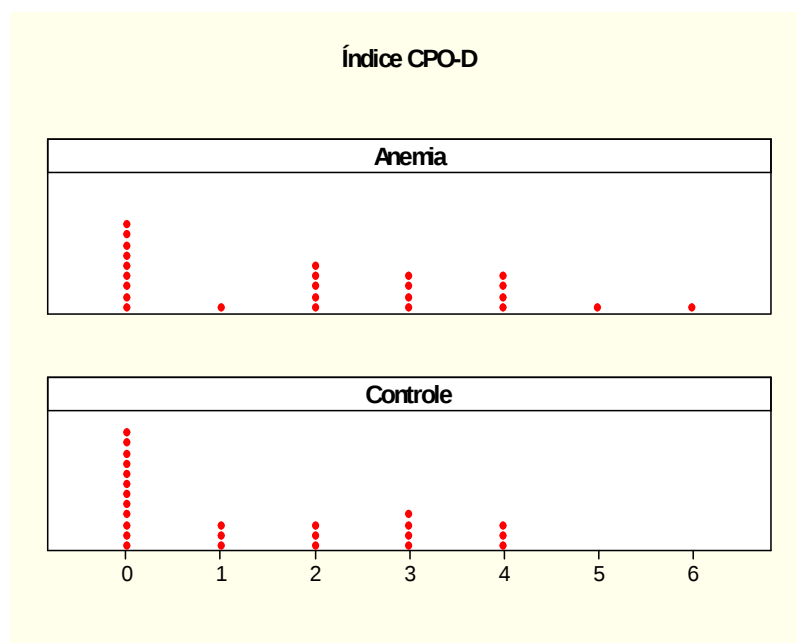


Figura 8 – Distribuição dos valores do índice CPO-D nos grupos em estudo.

## 5.2 Análise salivar

### 5.2.1 Análise do fluxo salivar

Para o grupo anemia, 10 crianças apresentaram taxas de fluxo salivar normais, 08 apresentaram valores intermediários e 07 apresentaram valores reduzidos. Nenhuma criança do grupo de estudo apresentou taxa de fluxo salivar compatível com xerostomia. Para o grupo controle, 08 crianças apresentaram taxas de fluxo salivar normais, 04 apresentaram valores intermediários e 13 apresentaram valores reduzidos. Como no grupo de estudo, nenhuma das crianças do grupo controle apresentou taxa de fluxo salivar compatível com xerostomia (Figura 9).

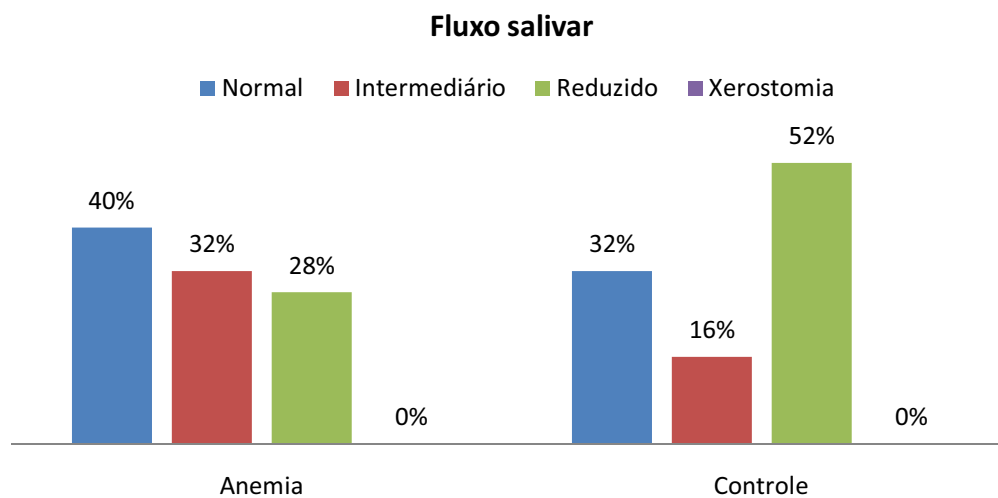


Figura 9 – Distribuição dos valores de fluxo salivar.

Tabela 3 – Análise descritiva para os valores de fluxo salivar

| Grupo    | N  | Média  | DP     | Mínimo | Máximo |
|----------|----|--------|--------|--------|--------|
| Anemia   | 25 | 0,9584 | 0,4438 | 0,20   | 1,8    |
| Controle | 25 | 0,7452 | 0,4452 | 0,14   | 1,6    |

N = número de pacientes; DP = desvio padrão;  $p = 0,097$ .

Não foi verificada diferença estatística significativa entre os grupos em estudo ( $p = 0,097$ ) (Figura 10).

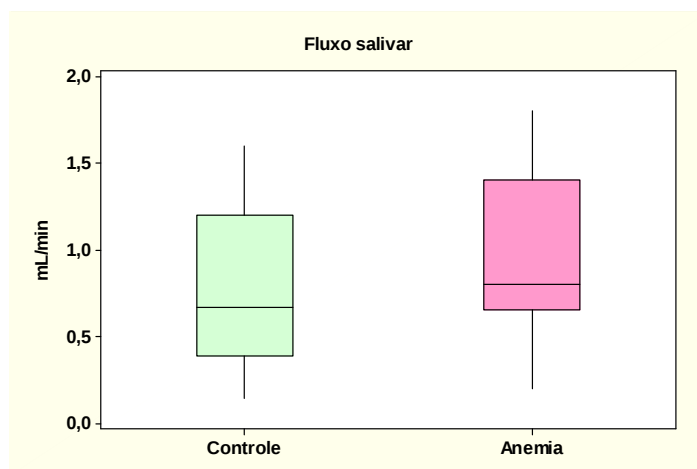


Figura 10 – Comparação dos valores de fluxo salivar entre os grupos em estudo.

### 5.2.2 Análise da capacidade tampão da saliva

Para o grupo de estudo, 04 crianças apresentaram valores de capacidade tampão salivar normais, 14 apresentaram valores limítrofes e 07 apresentaram valores baixos. Para o grupo controle, 10 crianças apresentaram valores de capacidade tampão salivar normais, 11 apresentaram valores limítrofes e 04 apresentaram valores baixos (Figura 11).

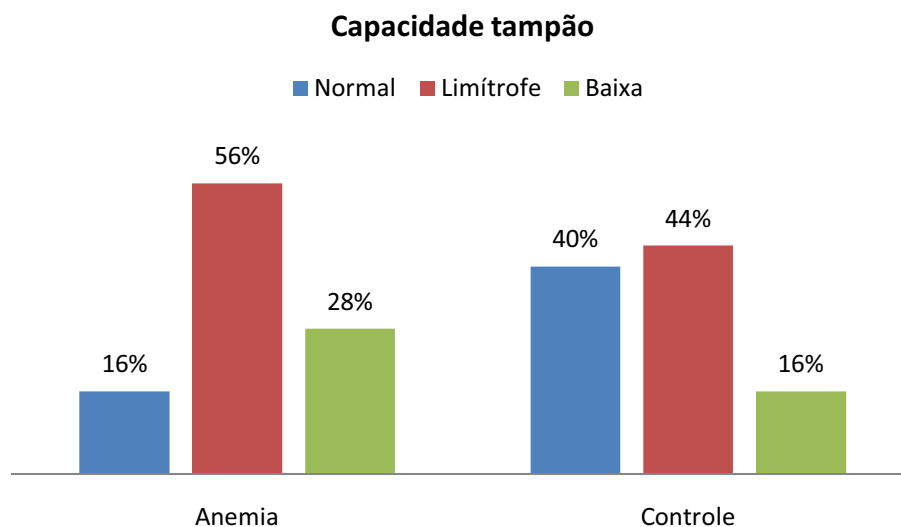


Figura 11 – Distribuição dos valores de capacidade tampão salivar.

Tabela 4 – Análise descritiva para os valores de capacidade tampão salivar

| Grupo    | N  | Média | DP    | Mínimo | Máximo |
|----------|----|-------|-------|--------|--------|
| Anemia   | 25 | 4,444 | 0,770 | 2,83   | 6,25   |
| Controle | 25 | 4,824 | 0,846 | 3,23   | 6,22   |

N = número de pacientes; DP = desvio padrão;  $p = 0,103$ .

Não foi verificada diferença estatística significativa entre os grupos ( $p = 0,103$ ) (Figura 12).

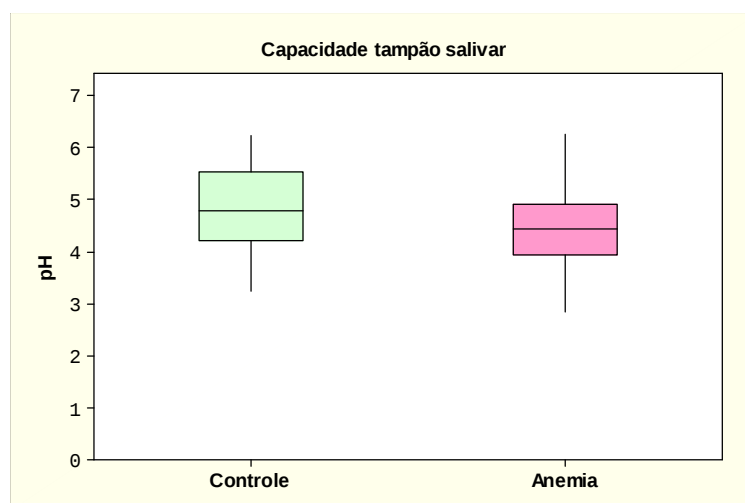


Figura 12 – Comparação dos valores de capacidade tampão salivar entre os grupos em estudo.

### 5.3 Análise microbiológica

Para o grupo de estudo, a contagem de EGM apresentou 21 crianças com valores baixos, enquanto 04 apresentaram valores intermediários. O grupo controle apresentou a mesma distribuição. Ambos os grupos não apresentaram valores classificados com alto (Figura 13).

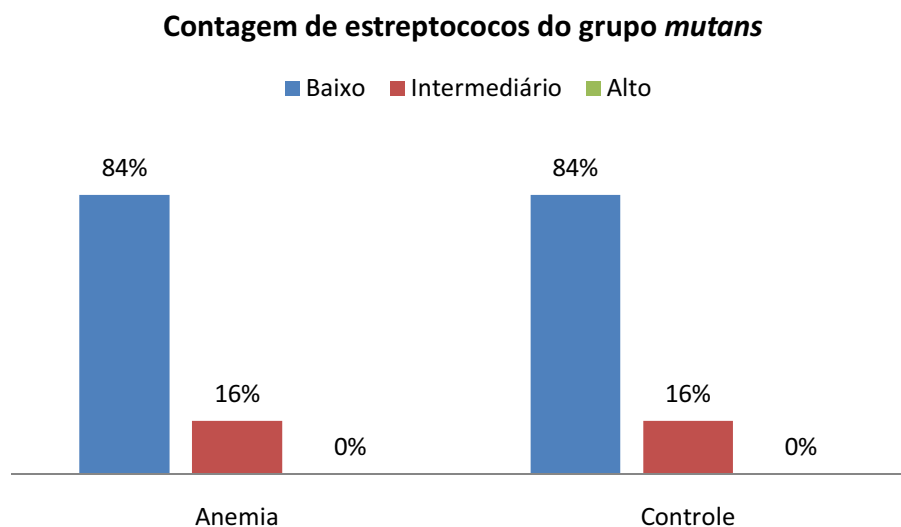


Figura 13 – Distribuição dos valores de UFC/mL de estreptococos do grupo *mutans*.

Com relação à contagem de lactobacilos, no grupo de estudo, 13 crianças apresentaram valores altos, 01 apresentou valor moderado, 02 apresentaram valores baixos e 09 apresentaram valores classificados como negativos, com relação à atividade de cárie. Para o grupo controle, a contagem de lactobacilos apresentou 08 crianças com valores altos, 03 com valores moderados, 02 com valores baixos e 12 com valores classificados com negativo, com relação à atividade de cárie (Figura 14).

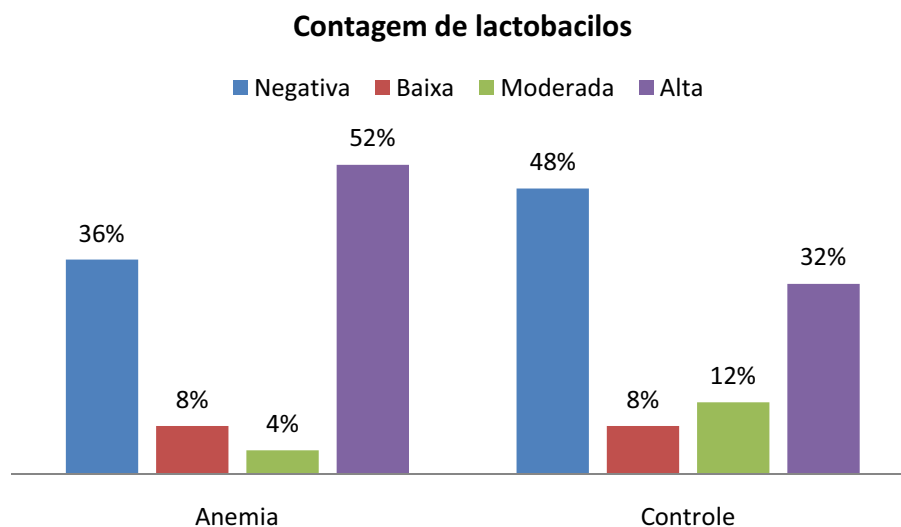


Figura 14 – Distribuição dos valores de UFC/mL de lactobacilos.

Com relação à contagem de leveduras, no grupo de estudo, 14 crianças apresentaram valores altos, 01 apresentou valor moderado, 02 apresentaram valores baixos e 08 apresentaram contagens negativas. Para o grupo controle, a contagem de leveduras revelou 05 crianças com valores altos, 02 com valores moderados, 07 com valores baixos e 11 com contagens negativas (Figura 15).

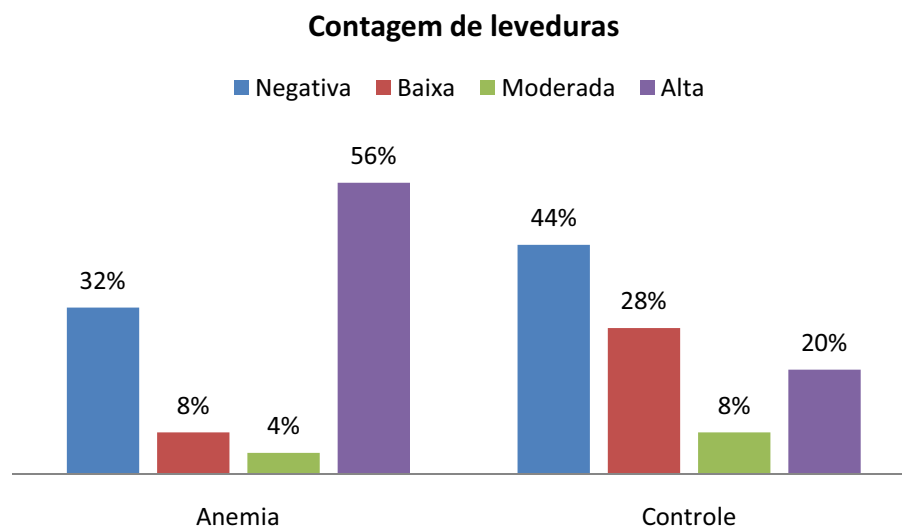


Figura 15 – Distribuição dos valores de UFC/mL de leveduras.

Tabela 5 – Análise descritiva para os valores de UFC/mL de microrganismos cariogênicos

|              | Grupo    | N  | Média | DP     | Mediana | Mínimo | Máximo |
|--------------|----------|----|-------|--------|---------|--------|--------|
| EGM          | Anemia   | 25 | 80273 | 193159 | 23500   | 110    | 972000 |
|              | Controle | 25 | 48000 | 46979  | 34500   | 650    | 143500 |
| Lactobacilos | Anemia   | 25 | 77113 | 132456 | 10500   | 0      | 520000 |
|              | Controle | 25 | 67389 | 134584 | 1350    | 0      | 554000 |
| Leveduras    | Anemia   | 25 | 11255 | 22573  | 1455    | 0      | 96500  |
|              | Controle | 25 | 1103  | 4484   | 5       | 0      | 22500  |

N = número de pacientes; DP = desvio padrão.

Quando comparados os valores das contagens de microrganismos cariogênicos entre os grupos em estudo, somente foi

verificada diferença estatística significativa para a contagem de leveduras ( $p = 0,0166$ ). Para EGM,  $p = 0,7415$  e lactobacilos,  $p = 0,4256$  (Figura 16).

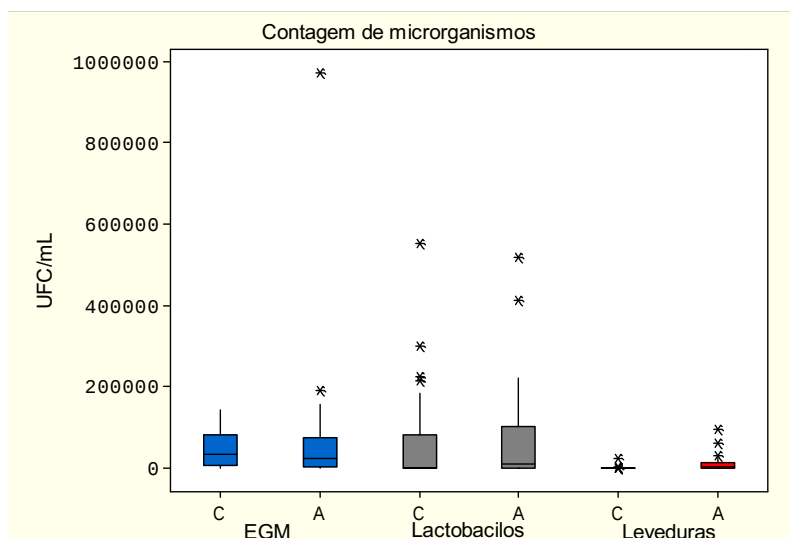


Figura 16 – Comparação dos valores de UFC/mL de microrganismos cariogênicos.

### 5.3.1 Contagem de bactérias cariogênicas segundo o antibiótico utilizado

Tabela 6 – Análise descritiva das contagens de bactérias cariogênicas

|              | Grupo | N  | Média  | DP     | Mediana | Mínimo | Máximo |
|--------------|-------|----|--------|--------|---------|--------|--------|
| EGM          | BZT   | 12 | 120013 | 273249 | 27250   | 110    | 972000 |
|              | PVO   | 13 | 43591  | 56044  | 23500   | 1800   | 156500 |
| Lactobacilos | BZT   | 12 | 78101  | 149155 | 10625   | 0      | 520000 |
|              | PVO   | 13 | 76202  | 121218 | 10500   | 5      | 411500 |

BZT = Benzetacil, PVO = Pen-Ve-Oral, N = número de pacientes; DP = desvio padrão.

Os valores das contagens de EGM quando comparados entre os grupos (Benzetacil e Pen-Ve-Oral) não apresentaram diferença estatística significativa ( $p = 0,446$ ). O mesmo ocorreu com a contagem de lactobacilos ( $p = 0,568$ ), mostrando que não houve variação da contagem de bactérias cariogênicas em função do antibiótico utilizado (Figura 17).

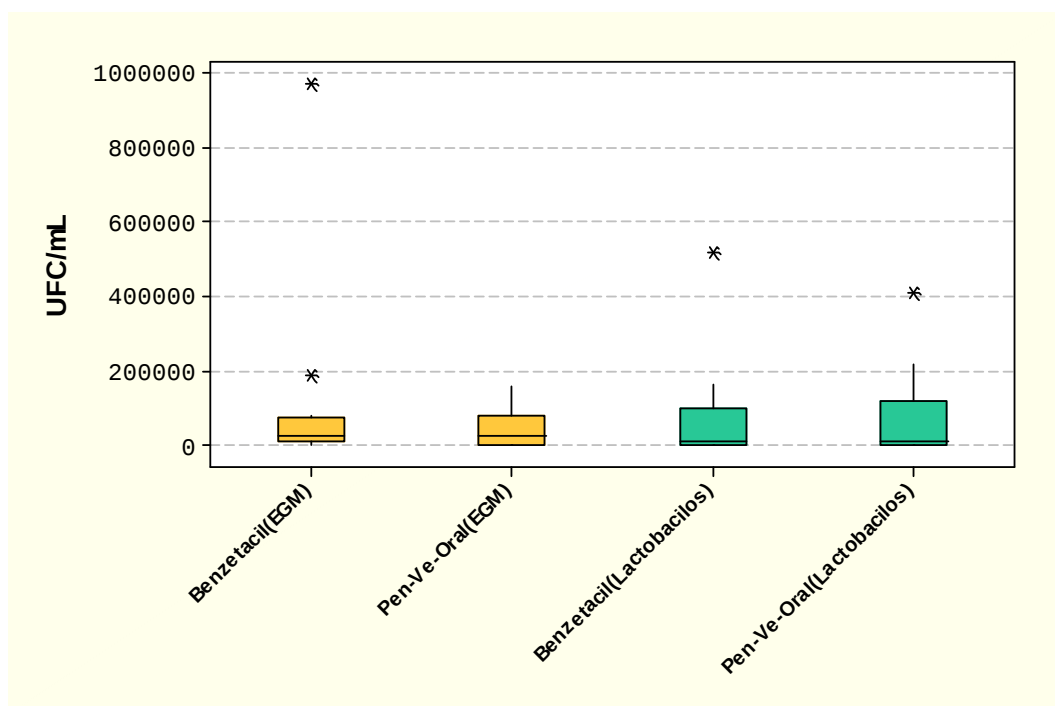


Figura 17 – Comparação dos valores das contagens de bactérias cariogênicas em função do antibiótico utilizado.

#### 5.4 Risco de cárie

Através do software Cariograma, no grupo de estudo, uma criança foi classificada com risco baixo, 04 com risco relativamente baixo, 05 com risco intermediário, 09 com risco alto e 06 com risco muito alto. No grupo controle, 03 crianças foram classificadas com risco baixo,

05 com risco relativamente baixo, 04 com risco intermediário, 07 com risco alto e 06 com risco muito alto.

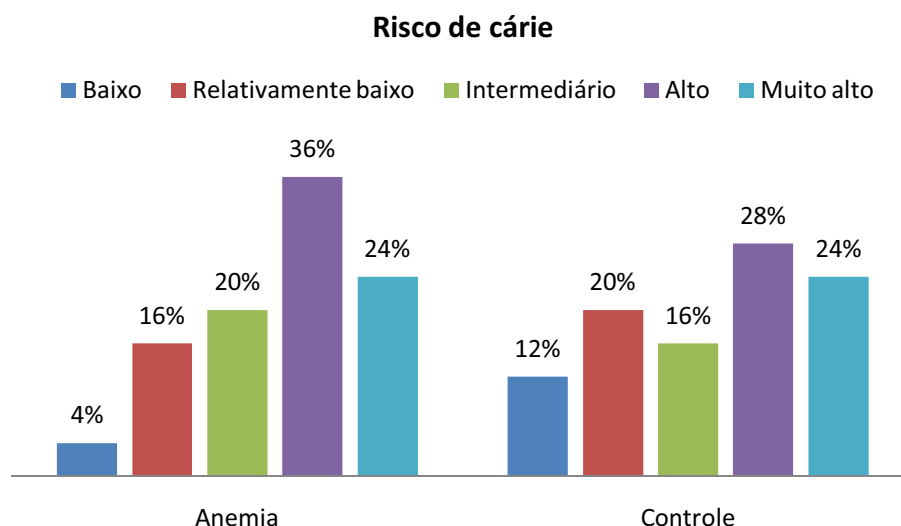


Figura 18 – Distribuição do risco de cárie nos grupos em estudo.

Os valores, quando comparados estatisticamente, não apresentaram diferenças significativas entre o grupo de estudo e controle ( $p = 0,762$ ).

### 5.5 Identificação dos isolados de leveduras

Foram isoladas 117 colônias sugestivas de leveduras, sendo 68 colônias isoladas do grupo de crianças com anemia falciforme e 49 colônias isoladas do grupo controle.

No grupo de estudo foram identificadas as seguintes espécies: 52 amostras de *C. albicans*, 05 de *C. dubliniensis*, 03 de *Candida famata*, 04 de *Candida rugosa*, 01 de *Candida sphaerica* e 03 de *Candida tropicalis* (Figura 19).

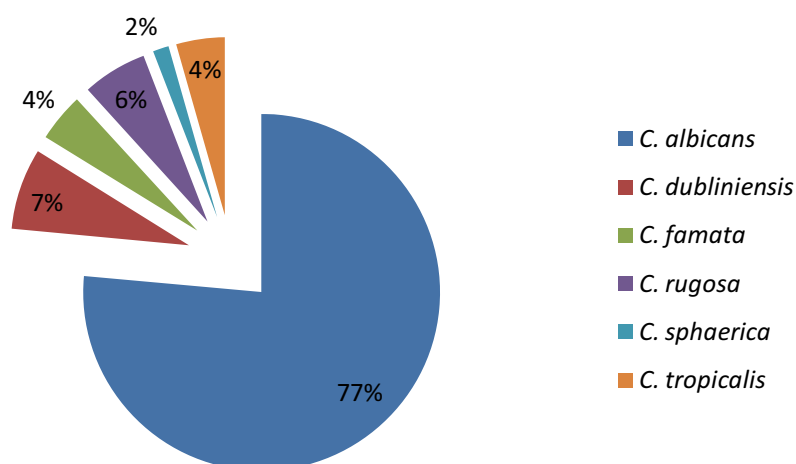


Figura 19 – Distribuição das espécies de leveduras isoladas do grupo de estudo.

No grupo controle foram identificadas as seguintes espécies: 28 amostras de *C. albicans*, 01 de *C. famata*, 18 de *Candida parapsilosis*, 01 de *C. tropicalis* e 01 de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 20).

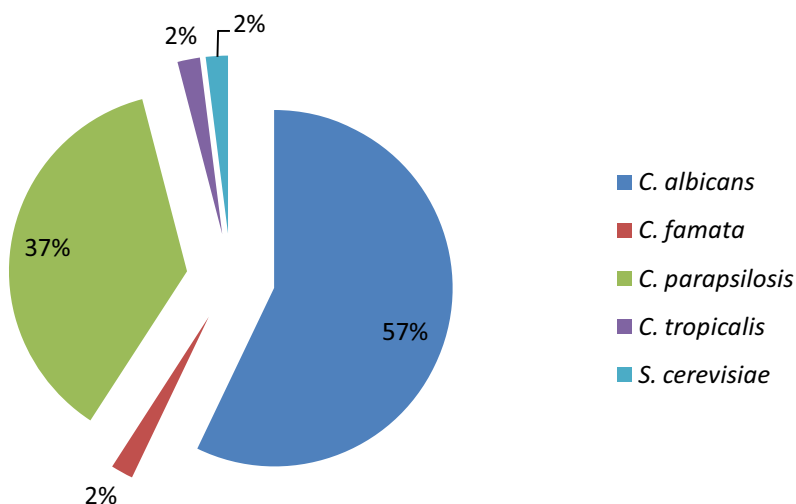


Figura 20 – Distribuição das espécies de leveduras isoladas do grupo controle.

### 5.5.1 Identificação genotípica de *C. dubliniensis*

As 05 amostras de *C. dubliniensis*, isoladas do grupo de estudo, previamente identificadas pelo kit API 20 C AUX tiveram a confirmação da identificação através da PCR (Figura 21).

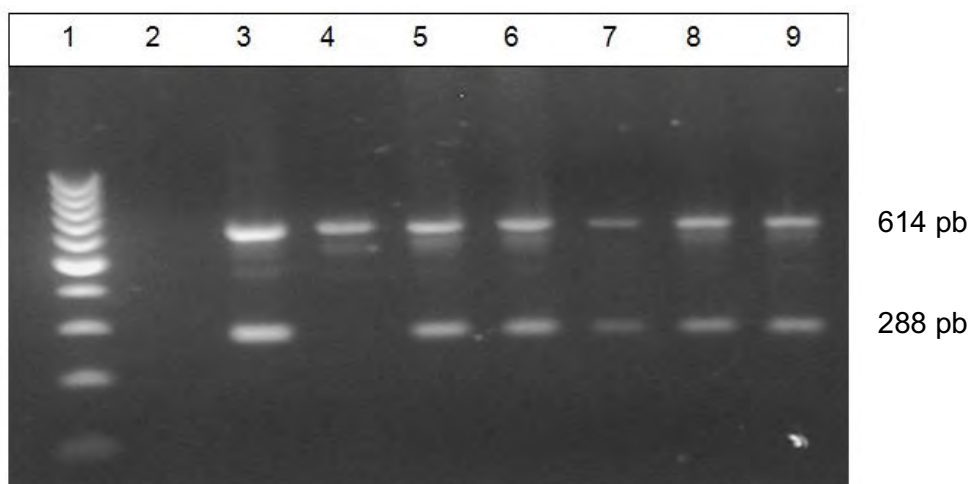


Figura 21 – Produtos da PCR das amostras de *C. dubliniensis*. 1 (padrão de peso molecular), 2 (controle negativo), 3 (controle positivo – *C. dubliniensis*), 4 (controle positivo – *C. albicans*), 5 – 9 (amostras de *C. dubliniensis*). Padrão de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Promega, EUA).

## 6 DISCUSSÃO

A AF, assim como muitas doenças sistêmicas, apresenta manifestações bucais. Na literatura, a maioria dos estudos que correlacionam AF e cavidade bucal se refere à dor orofacial, alterações histológicas e alterações ósseas e radiográficas.

São poucos os estudos correlacionam AF e cárie, além de apresentar resultados controversos. Laurence et al. (2002) citam o estudo de Okafor et al. (1986) onde segundo os autores, foi verificada uma reduzida prevalência de cáries (35,13%) em 37 indivíduos com AF (entre 14 e 33 anos, pareados por idade e sexo), tratados em um hospital na Nigéria, quando comparado ao grupo controle (24 indivíduos) onde a prevalência foi de 54%. Okafor et al. atribuem essa menor prevalência no grupo AF a um menor consumo de doces. Entretanto, os autores não descreveram como o índice de cárie foi avaliado, além de não apresentar a análise estatística. Além disso, não havia nenhuma referência à terapia profilática com penicilina.

Laurence et al. (2002) realizaram um estudo retrospectivo para verificar se pacientes com AF tinham índice de cáries mais elevado quando comparados a pacientes sem AF. Analisando a ficha clínica de todos os pacientes com tratados no Howard University's College of Dentistry (Nova York, EUA) entre 1983 e 1999, os autores encontraram 35 pacientes (com idade média de 30,4 anos) com AF que foram pareados (por idade e raça) na proporção de 4:1 de pacientes sem AF com pacientes com AF. Os autores encontraram índice CPO-S médio igual a 33 no grupo com AF, enquanto no grupo controle foi de 26,2. Para o índice CPO-D médio, o valor foi igual a 12 no grupo com AF e 9,9 no grupo controle. Os valores de CPO-S e CPO-D médios foram maiores no

grupo AF, entretanto não diferiram estatisticamente do grupo controle. Apesar disso, representam números altos e que merecem atenção. Os autores não coletaram dados sobre a terapia antibiótica profilática na qual normalmente os pacientes com AF são submetidos.

O'Rourke e Hawley (1998) estudando um grupo de 51 pacientes entre 13 e 45 anos, com DF (pareados 1:1 com pacientes sem DF) na Jamaica verificaram alta prevalência de cárie nesses pacientes (CPO-D médio = 6,9), entretanto não foi verificada diferença estatística quando comparado com o grupo controle (CPO-D médio = 7,3). Um ponto importante nesse estudo é que os autores não comentaram se todos os pacientes do grupo de estudo se encontravam sob terapia profilática com penicilina, pois a DF engloba um grupo de doenças com genótipos diferentes, na qual a duração da terapia profilática pode variar em função do genótipo.

Fukuda et al. (2005) avaliaram o índice ceo-s/CPO-S (superfícies cariadas, perdidas e obturadas) e verificaram uma menor prevalência de cáries nos grupos de estudo (grupo 1 – AF com profilaxia antibiótica e 2 – AF sem profilaxia antibiótica). O grupo AF com profilaxia antibiótica apresentou índice ceo-s/CPO-S médio de 0,21 enquanto para o grupo controle foi de 5,1. Para o grupo AF sem profilaxia antibiótica, o índice ceo-s/CPO-S médio foi de 3,89 e 5,78 no grupo controle. Em ambos os grupos as diferenças foram estatisticamente significantes. Segundo os autores, uma possível explicação para esses resultados seria que terapia com penicilina, durante o período chamado de “janela de infectividade” (segundo Caufield et al. (1993), período na qual ocorre a aquisição inicial de EGM, que vai dos 19 aos 31 meses de idade), preveniria a aquisição ou suprimiria os EGM abaixo de níveis detectáveis, resultando em uma menor prevalência de cáries. Isso aconteceria somente enquanto o paciente estivesse sob tratamento com penicilina, pois após a suspensão da profilaxia, haveria o aumento do número de EGM que antes se encontravam em níveis indetectáveis. Com relação à

exposição à dieta cariogênica, não foram verificadas diferenças estatísticas nos grupos 1 e 2 quando comparados aos respectivos grupos controles, sendo que tanto para o grupo 1 (47%) quanto para o grupo 2 (43%) a frequência diária de exposição a dieta cariogênica foi entre 6 a 10 exposições para a maior partes dos das crianças. A escolaridade materna, outro fator importante em estudos sobre cárie, foi semelhante entre os grupos, com aproximadamente 80% das mães com o ensino médio completo.

No que se refere à avaliação de fatores microbianos relacionados ao risco de cárie, encontra-se na literatura um único estudo realizado por Fukuda et al. (2005). Estes autores utilizaram o kit Dentocult SM Strip *mutans* (Orion Diagnostica, Finland) para verificação da presença de EGM em crianças com AF entre 3 a 6 anos de idade (grupo 1) que estavam sob profilaxia antibiótica com penicilina oral (250 mg duas vezes ao dia) era significativamente inferior em relação ao grupo controle (crianças sem AF, pareados por idade, raça e condições socioeconômicas). Nenhuma das 30 crianças que formavam o grupo de estudo apresentou cultura positiva para EGM, enquanto no grupo controle, 70% das crianças apresentaram positividade. Neste trabalho, os autores somente compararam a presença ou não de EGM entre os grupos em estudo, não foi comparado o número de UFC/mL de saliva obtidos nos grupos em estudo. Estes resultados diferem das observações do presente estudo, onde 100% das crianças do grupo AF e grupo controle foram positivos para EGM na cavidade bucal.

No mesmo trabalho, em um segundo grupo de estudo, composto por crianças de 6 a 12 anos, com AF, porém que não estavam sob profilaxia com penicilina, também apresentou diferença estatística significativa na presença EGM (47%) quando comparado ao grupo controle (97%). No presente estudo não foi possível avaliar um grupo de pacientes com AF sem profilaxia com penicilina, já que no Brasil quase a totalidade das crianças diagnosticadas como AF (genótipo SS) são

submetidas a esta terapia. A falta de descrição detalhada da doença nos pacientes (genótipo), utilização de teste de *screening* para EGM, avaliação qualitativa (presença ou ausência) dificultam a comparação do trabalho de Fukuda et al. (2005) com os resultados obtidos no presente estudo.

Alguns outros estudos anteriores em outras condições, relataram resposta variada de estreptococos bucais frente à terapia antibiótica. Baglie et al. (2007) analisaram as concentrações plasmáticas e salivares da amoxicilina administrada por via oral em dose única de 875 mg, nos tempos 0, 1/2, 1, 2, 4, 8 e 12 h após a administração da droga. Os autores verificaram diminuição estatisticamente significativa da contagem de estreptococos, anaeróbios e contagem total de microrganismos a partir de 60 min após a administração do medicamento, mantendo efetiva redução dos níveis de microrganismos bucais após 12 h de administração do fármaco. Bilavsky et al. (2008) estudando estreptococos do grupo viridans presente na cavidade bucal de pacientes com febre reumática aguda (entre 7 e 24 anos) e tratados com penicilina benzatina, verificou a que dentre as espécies de estreptococos isoladas dos pacientes estudados, *S. mutans* somente foi isolado da cavidade bucal dos pacientes do grupo controle, correspondendo a 7,1% dos isolados bucais de estreptococos do grupo viridans.

Em um estudo com crianças com história de febre reumática recebendo profilaxia com penicilina, Naiman e Barrow (1963) encontraram estreptococos da flora bucal resistentes em 81% dos pacientes em estudo, enquanto no grupo controle com crianças saudáveis e que não estavam sob tratamento com penicilina não apresentaram estreptococos resistentes. Esses resultados são similares aos encontrados por Sprunt et al. (1968) onde uma população similar apresentou 75% de estreptococos resistentes contra 0% no grupo controle. Entretanto, em ambos os estudos o tratamento profilático era administrado por via oral. Sprunt et al. (1968) relatou 15% de resistência

moderada a alta para penicilina em estreptococos  $\beta$ -hemolíticos (*S. pneumoniae* e viridans) em um grupo de crianças com história de febre reumática recebendo injeções mensais de penicilina benzatina. Chayakul et al. (2002) encontraram somente 5,6% de estreptococos do grupo viridans da flora bucal com resistência intermediária a penicilina benzatina G, não foram encontradas cepas com alta resistência. Spencer et al. (1970) verificaram a resistência à penicilina de bactérias periodontais em adultos com febre reumática recebendo penicilina oral, intramuscular e em pacientes controle saudáveis. A taxa de resistência foi 42%, 5% e 23% respectivamente.

A resistência à penicilina dos estreptococos viridans já é descrita desde 1949, e esses relatos de resistência variam podem chegar até 56,3%. A tendência frente à resistência a penicilina é correlacionada com exposição prévia à terapia antibiótica (Krumwiede, 1949; Fleming et al., 1990; Doern et al., 1996). Mokaddas et al. (2007), analisando *in vitro* a suscetibilidade de cepas de estreptococos bucais aos antibióticos, dentre eles *S. mutans*, verificou que 53,3% das 20 cepas de *S. mutans* avaliadas foram suscetíveis a penicilina.

Verificamos em nosso estudo que as contagens EGM não apresentaram diferença significativa entre os grupos AF e controle, sugerindo que a profilaxia prolongada com penicilina parece não ter apresentado efeito significativo sobre este grupo de microrganismos. Esse resultado difere da maioria dos estudos prévios que analisavam a ação da penicilina sobre estreptococos bucais, incluindo o único estudo existente em pacientes com AF. Esta observação pode estar relacionada a diferenças entre metodologias e populações estudadas, e a sensibilidade de cada método de avaliação utilizado. Possivelmente, a penicilina possa reduzir a contagem total de estreptococos bucais, porém quando analisados somente os EGM (que no homem corresponde às espécies *S. mutans* e *S. sobrinus*, em sua maioria) a sua ação pode não ser

significativa, já que a suscetibilidade ao antibiótico pode variar em função da espécie de estreptococo avaliada.

Bretas et al. (2008) ressaltam que para uma melhor avaliação do potencial cariogênico de um indivíduo deve-se levar em consideração o fluxo salivar, capacidade tampão, o índice CPO-D e/ou ceo-d, presença de biofilme dentário, higiene bucal, doenças sistêmicas, uso de medicamentos, uso prévio e/ou atual de suprimento de flúor, frequência de ingestão de açúcar e contagem de microrganismos, pois esses agentes predisponentes analisados isoladamente não servem como índices absolutos na determinação da doença cárie. Assim, baseado nessa complexa interação de fatores da qual é resultante a cárie dentária, optou-se pela utilização do software Cariograma (Petersson, 2003) com o objetivo de reunir as informações obtidas do paciente, chegando a um perfil de risco de cárie. Através dos resultados obtidos, verificou-se que mais da metade do grupo de estudo (60%) apresentou risco de cárie alto (36%) e muito alto (24%), não havendo diferença estatística em relação ao grupo controle.

Analisando os resultados obtidos para grupo de estudo separadamente, verificamos que na maioria dos testes, tanto salivares quanto microbiológicos, a maior parte dos resultados se situaram em níveis críticos: fluxo salivar (60% com valores entre intermediário e baixo), capacidade tampão (84% com valores entre limítrofe e baixo), contagem de lactobacilos (56% com valores entre moderado e alto), contagem de leveduras (60% com valores entre moderado e alto), a única exceção foi a contagem de EGM (84% dos pacientes apresentaram valores classificados como baixos). A correlação inversamente proporcional encontrada entre as contagens de EGM e lactobacilos possivelmente pode ter ocorrido devido à ação inibitória de lactobacilos sobre EGM. Estudos demonstraram que os lactobacilos podem mediar a inibição do crescimento de EGM em modelos animais e *in vitro* (Michalek et al., 1981; Ishihara et al., 1985). Os lactobacilos têm geralmente uma boa habilidade

em produzir ácidos orgânicos, sobrevivem a condição de baixo pH e são encontrados em grandes números na dentina cariada (Edwardsson, 1974; Badet et al., 2001). Esta capacidade também pode ajudar na inibição de EGM diretamente, ou indiretamente via geração de outros mediadores como proteínas, bacteriocinas ou metabólitos que são ativados em pH baixo (Abee et al., 1995; Makras; De Vuyst, 2006). A produção máxima de bacteriocinas por bactérias produtoras de ácido láctico ocorre principalmente entre pH 4,5 e 5,5 (Calderon-Santoyo et al., 2001; Delgado et al., 2007). A capacidade inibitória mediada por bacteriocina dependente de pH foi demonstrada por amostra de *Lactobacillus rhamnosus in vitro*, onde a substância inibitória reduziu o crescimento de *S. sobrinus* somente em torno de pH 5 (Meurman et al., 1995). Segundo Simark-Mattsson et al. (2009), o pH médio é menor quando a inibição de EGM esta completa, sugerindo que um baixo pH está relacionado a uma maior inibição efetiva.

A quantificação de lactobacilos na saliva pode ser utilizada no monitoramento da dieta do paciente, pois altos níveis desse microrganismo na saliva apresentam correlação com o consumo de carboidratos (Rego; Jorge, 2007). Entretanto somente 24% das crianças com AF relataram ingerir doces e guloseimas 3 ou mais vezes ao dia, dados que possivelmente não refletem a realidade, levando em consideração que o ceo-d médio foi igual 1,44 e o CPO-D médio foi igual a 2. Segundo Peres et al. (2000), crianças que consumiram produtos cariogênicos, duas a três vezes ao dia, todos os dias, tiveram 4,41 vezes mais chances de ter alta severidade de cárie quando comparadas com crianças que consumiram esses produtos no máximo uma vez ao dia. Provavelmente, as crianças com AF ingerem mais açúcar do que relataram em nosso estudo, pois dieta rica em sacarose exerce papel fundamental na etiologia da cárie dentária, além disso, a consistência e frequência de ingestão interferem com o poder cariogênico dos microrganismos (Mateos, 1999), que associado aos resultados dos testes salivares e microbiológicos realizados, juntamente com uma higienização

deficiente, explicam o fato da maior parte deste grupo ter sido classificado como risco alto e muito alto de cárie.

Outro fator de risco que deve ser considerado é a presença de açúcares na formulação dos medicamentos pediátricos. A utilização crônica de medicamentos, realizada muitas vezes por pacientes com necessidades especiais, tem sido apontado na literatura (Mariri et al., 2003) como um importante fator de risco ao desenvolvimento de lesões de cárie. Esse fato está associado à adição de açúcares nas formulações pediátricas que visam melhorar a palatabilidade do produto (antibióticos e xaropes). Segundo Nik-Hussein et al. (1988) a sacarose é o carboidrato simples mais utilizado e sua concentração varia de 29,4% a 61,2%, o que ao mesmo tempo confere ao produto valores baixos de pH. Sahgal et al. (2002) compararam a prevalência de cárie em crianças que utilizavam cronicamente medicação via oral com aquelas que não a utilizavam, e verificou que as crianças que ingeriam a medicação apresentaram maiores índices de CPO-D e ceo-d, e que a severidade das lesões progrediam com o aumento do tempo de utilização do medicamento. Por outro lado, segundo o estudo de Campos et al. (2006), não foi verificada correlação entre a ingestão de medicamentos e os índices de cárie em pacientes com necessidades especiais, concordando com os achados de Mariri et al. (2003). Segundo Campos et al. (2006) a possibilidade dos medicamentos estarem associados com o aumento do risco à cárie é muito pequena quando comparados com outros fatores de risco como a higiene bucal e a dieta. Em nosso estudo, 13 (52%) dos pacientes tomavam a medicação por via oral (Pen-Ve-Oral), o que poderia ser um fator adicional ao risco de cárie. A informação da quantidade de açúcar que compõe este medicamento não foi disponibilizada pela empresa fabricante. Contudo, a análise comparativa da presença de EGM e lactobacilos em pacientes com terapia via oral (Pen-Ve-Oral) e via intramuscular (Benzetacil) não mostrou diferença significativa. Não foi possível incluir pacientes com a mesma via de administração no grupo de

estudo, devido aos vários fatores de exclusão adotados no presente trabalho. Para o fechamento da amostra de crianças com AF (genótipo SS) avaliada, foram examinados cerca de 50 pacientes em tratamento no ambulatório de Hematologia Pediátrica do Hospital São Paulo, considerado centro de referência no tratamento da doença no Brasil.

A OMS estabelece a seguinte escala de severidade quanto à prevalência da cárie: CPO-D entre 1,2 e 2,6 = prevalência baixa; CPO-D entre 2,7 e 4,4 = prevalência média; CPO-D entre 4,5 e 6,5 = prevalência alta e CPO-D maior que 6,5 = prevalência muito alta. Esta organização preconizava como meta para o ano 2000, para crianças de 12 anos, o CPO-D com valor máximo igual a 3,0 (Bretas et al., 2008). As metas da OMS para saúde bucal em 2010 são: 90% das crianças sem cárie aos 5 e 6 anos, CPO-D menor que 1 aos 12 anos, não haver perda dentária por cárie ou doença periodontal aos 18 anos (Gomes et al., 2004). O CPO-D médio igual a 2 obtido no grupo de estudo o classifica como baixa prevalência de cárie, entretanto, esse valor é maior que a meta prevista pela OMS em 2010 (para as crianças aos 12 anos), levando-se em consideração que o nosso grupo de estudo está abaixo de 12 anos. Além disso, devemos considerar a presença da dentição mista nesse grupo e ceo-d médio de 1,44. Isso seria como se cada indivíduo apresentasse 3,44 dentes cariados, perdidos ou obturados, entretanto, a OMS não estabelece um valor médio adequado para crianças com dentição mista.

A presença de biofilme dentário, um importante fator a ser considerado na avaliação do risco de cárie, infelizmente não pôde ser avaliado em nosso estudo devido à falta de estrutura física adequada para a realização de um exame clínico mais apurado, já que os procedimentos foram realizados no ambulatório de atendimento.

Com relação à escovação, estudos salientam que a falta de escovação adequada pode favorecer o aparecimento de lesões de cárie (Gizani et al., 1999; Vanobbergen et al., 2001; Silva et al., 2006). A

maior parte do nosso grupo de estudo (56%) relatou escovar os dentes 3 ou mais vezes ao dia. Contudo, através do exame clínico, foi verificado que a maioria das crianças apresentava higienização deficiente, e muitas vezes biofilme facilmente visível, apesar desses dados não terem sido registrados.

Escolaridade dos responsáveis pela família tem sido relacionada com a severidade da cárie dentária (Verrips et al., 1993; Schou; Uitenbroek, 1995). Peres et al. (2000), avaliando crianças entre 3 e 12 anos com relação a severidade de cárie, verificou que no grupo das crianças que apresentavam alta severidade de cárie, 38% dos pais e 32% das mães possuíam ensino fundamental incompleto, apoiando a hipótese de que quanto menor a escolaridade dos responsáveis, maior o grau da severidade da cárie. Nossos resultados mostraram que 44% dos pais e 44% das mães apresentavam ensino fundamental incompleto.

A associação entre de contagem de microrganismos (EGM, lactobacilos e leveduras) e análise salivar (fluxo salivar e capacidade tampão) como preditivo de risco de cárie tem sido utilizado em vários estudos e embasou a seleção dos testes no presente estudo. Aguilera Galaviz et al. (2005), estudaram o risco de cáries em 150 crianças controle entre 10 e 13 anos no México. Os autores avaliaram EGM (kit Dentocult SM, Orion Diagnostica, Finland), lactobacilos (kit Dentocult LB, Orion Diagnostica, Finland), capacidade tampão (Dentobuff Strip, Orion Diagnostica, Finland) e índice CPO-D. Foi verificado que as crianças apresentaram CPO-D médio igual a 1,58. Analisando a capacidade tampão da saliva, foi verificado que 8 crianças apresentaram capacidade tampão entre 4 e 6, enquanto as demais crianças apresentaram valores maior ou igual a 6. Com relação à contagem de EGM, 42% dos pacientes apresentaram número de UFC/mL de saliva menor que  $10^5$ , 41,34% apresentaram valores entre  $10^5$  e  $10^6$ , enquanto 16,66% apresentaram valores acima de  $10^6$ . Para a contagem de lactobacilos, 36% apresentaram valores de UFC/mL de saliva iguais a

$10^3$ , 22% apresentaram valores iguais a  $10^4$ , 22,34% apresentaram valores iguais a  $10^5$  e 16,66% apresentaram valores iguais a  $10^6$ . Os autores verificaram uma correlação positiva entre o valor de UFC/mL dos microrganismos avaliados e experiência de cárie. Conforme a quantidade de EGM e/ou lactobacilos aumentava na saliva havia um aumento no valor do índice CPO-D.

Os tecidos bucais são considerados porta primária de entrada para todos os patógenos oportunistas, incluindo as espécies do gênero *Candida* (de Repentigny et al., 2004). As leveduras são habitantes comensais da cavidade bucal, sendo o gênero *Candida* o mais representativo, encontrada principalmente na língua e palato (Hazen, 1995; Prieto-Prieto; Calvo, 2004). Esta condição microbiológica propicia comumente uma relação de equilíbrio entre parasita-hospedeiro, diante da manutenção da integridade das barreiras teciduais, relação harmônica da microbiota autóctone e funcionamento adequado do sistema imunológico humano, havendo em contrapartida por parte do fungo leveduriforme, permanência equilibrada da capacidade de aderência e da produção de enzimas e toxinas. Alterações físicas, químicas, iatrogênicas e mecânicas, que se processem na cavidade bucal, como a mastigação, possam entre diversos fatores descritos favorecer a ruptura do equilíbrio estabelecido entre o fungo e o hospedeiro fazendo com que as infecções por *Candida* sejam de origem geralmente endógena (Calderone; Fonzi, 2001).

Somente uma tênue linha separa o potencial patogênico do comensalismo: os fatores predisponentes incluem uma longa lista de doenças endócrinas, dietas ricas em carboidratos, pacientes terminais, uso de antibióticos de largo espectro ou esteróides, xerostomia e alterações imunológicas, quer adquiridas ou congênitas (Odds, 1988). Em pacientes imunocomprometidos, infecções por *Candida* podem convergir para disseminação sistêmica. Há múltiplas condições de imunocomprometimento que aumentam a suscetibilidade para infecções

fúngicas bucais tais como: diabetes, anemias, terapia anti-rejeição para órgãos em pacientes transplantados e doenças auto-imunes (síndrome de Sjögren). Estas requerem estudos para auxiliar no desenvolvimento de modalidades terapêuticas confiáveis (de Repentigny et al., 2004).

O uso prolongado de antibióticos, particularmente de amplo espectro (tetraciclina) pode causar candidose mais comumente que os medicamentos de espectro limitado, pois a supressão da microbiota bacteriana bucal comensal pela medicação pode favorecer a infecção fúngica oportunista (Dreizen, 1984; Como; Dismukes, 1994; Birman, 2002). No entanto, não existem estudos anteriores que avaliaram o efeito da profilaxia antibiótica em pacientes com AF sobre a microbiota bucal fúngica. Outro fator predisponente à ocorrência de infecção fúngica bucal nestes pacientes seria a imunossupressão decorrente da doença, o que agrega maior importância ao estudo do assunto.

Scherma (2005) estudou os efeitos da penicilina, metronidazol e tetraciclina no desenvolvimento de candidose e na recuperação de *C. albicans* na cavidade bucal de ratos. Foram utilizados 96 ratos não portadores do gênero *Candida* na cavidade bucal, divididos em duas etapas: candidose experimental, na qual os animais foram medicados por períodos de 7, 15 e 30; e recuperação e contagem, após inoculação com *C. albicans*. O autor verificou que a língua foi a região mais acometida por lesões de candidose, sendo que as maiores lesões foram encontradas nos animais medicados com tetraciclina. Verificou também que os animais medicados com penicilina apresentaram os maiores índices de colonização do epitélio. A recuperação de *C. albicans* foi mais freqüente nos grupos que receberam penicilina ou tetraciclina, uma vez que 50% dos ratos apresentaram contagens positivas até o 307º dia. O autor concluiu que um maior número de lesões de candidose experimental, assim como uma maior média do logaritmo do número das UFC/mL de *C. albicans* recuperadas foram encontradas nos grupos que receberam antibioticoterapia.

Nosso estudo verificou que crianças com AF apresentaram níveis salivares de leveduras significativamente maiores que o grupo controle, o que pode acarretar maior predisposição à ocorrência de infecções fúngicas. A adoção de medidas preventivas visando o controle e regulação da microbiota bucal desses pacientes no sentido de se evitar infecções fúngicas locais com possível disseminação sistêmica deve ser cuidadosamente avaliada. Atenção limitada tem sido dedicada ao papel da higiene bucal na prevenção da candidose bucal em pacientes imunocomprometidos (Grimoud et al., 2005; Fanello et al., 2006). Braga (2007) ressalta que a higiene bucal adequada é importante não só a fim de se evitar infecções dentárias, mas também prevenir complicações da DF.

Dentre as alterações dentárias encontradas nos pacientes com AF, autores citam os transtornos na mineralização do esmalte e dentina (Taylor et al., 1995; Bishop et al., 1996; da Fonseca et al., 2007) o que é um fator crítico, pois aumenta a suscetibilidade do paciente à cárie. Ou ponto importante é que a dentina hipomineralizada facilita a colonização e infecção por leveduras, tornando-se um fator de risco para infecções pulpares por estes microrganismos (Siqueira; Sen, 2004). As espécies do gênero *Candida*, que compõe a maior parte das leveduras da microbiota bucal (Scherma et al., 2004), estão intimamente correlacionadas com infecções pulpares, não só infecções primárias, mas principalmente em infecções secundárias e persistentes (Siqueira; Sen, 2004), dentre outros microrganismos. Em nosso estudo, as crianças com AF apresentaram altas contagens de leveduras, que quando associadas com alterações da mineralização do esmalte e dentina, como no caso dos pacientes com AF, constituem um grupo de risco para o aparecimento de infecções pulpares, quando na presença de cáries ou outra forma de exposição de dentina.

Infecções por *Candida* podem ser causadas por diferentes espécies. *C. albicans* continua sendo a espécie mais prevalente, mas

espécies de *Candida* não-*albicans*, particularmente *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *C. parapsilosis*, têm adquirido importância crescente (Yang, 2003). Espécies menos comuns como *C. famata* e *C. rugosa* têm sido relatadas como novas espécies oportunistas, emergentes no gênero *Candida* (Krcmery; Barnes, 2002; Pfaller et al., 2006). Desta forma, o conhecimento das principais espécies de *Candida* presentes no grupo de estudo se faz necessário no sentido de que possam ser desenvolvidas medidas terapêuticas e/ou profiláticas adequadas. A utilização do kit API 20C AUX mostrou ser eficaz na identificação de leveduras através de uma metodologia simples e rápida. A acurácia na diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* também foi verificada pela confirmação genotípica da identificação em 100% dos casos.

No presente estudo, verificou-se a identificação de *C. rugosa* no grupo AF. De Melo et al. (2007) relataram o isolamento de uma amostra de *C. rugosa* a partir de hemocultura de uma criança com DF. Os autores verificaram que esta cepa foi capaz de degradar albumina, IgG e fibrinogênio humano. Outro achado incomum foi o isolamento de *C. sphaerica* dentre os isolados do grupo de estudo. Na literatura, foi encontrado apenas um relato sobre isolamento dessa espécie em leite humano (Rosa et al., 1990). Não foram encontrados relatos sobre isolados bucais de *C. sphaerica*, nem sua relação como possível patógeno oportunista. Na área industrial *C. sphaerica* tem sido utilizada na produção de biossurfactantes (Fontes et al., 2008).

Em nosso estudo, *S. cerevisiae* foi isolado da cavidade bucal de uma das crianças do grupo controle. Embora *S. cerevisiae* tenha sido isolado do trato digestivo, vagina, pele e orofaringe de pacientes saudáveis (Kwon-Chung; Bennett, 1992), atualmente várias infecções produzidas por *S. cerevisiae* têm sido relatadas (Dougherty; Simmons, 1982; Cimolai et al., 1987; Sethi; Mandell, 1988; Manzella et al., 1989; Tawfik et al., 1989; Aucott et al., 1990; Nielsen et al., 1990; Chertow

et al., 1991; McCusker et al., 1994; Savini et al., 2008). O aumento do número de pacientes com risco para debilidade e doenças crônicas, tratamentos imunossupressores, terapias com antibióticos de amplo espectro, nutrição parenteral, uso de cateteres intravenosos e relativa resistência fúngica aos azóis tem resultado no aumento da incidência de infecções por leveduras não-*albicans* e não-*Candida*, incluindo *S. cerevisiae* (Savini et al., 2008). Savini et al. (2008) relatam o caso de uma paciente de 44 anos que apresentava vaginite severa causada por *S. cerevisiae*. A paciente aparentemente não apresentava qualquer fator predisponente, entretanto, através da anamnese verificou-se que a paciente tinha história recente de administração oral de amoxicilina com clavulanato uma semana antes, para tratamento de uma bronquite aguda. A cada ano há aumento no número de infecções produzidas por esta espécie que tem levado alguns autores a sugerir que *S. cerevisiae* “está perdendo sua inocência” (Bouza; Muñoz, 2004). Embora estas infecções ocorram principalmente em pacientes severamente debilitados, traumatizados ou imunossuprimidos, há alguns casos onde infecções têm sido relatadas em pacientes que não apresentavam predisposição óbvia (Jensen et al., 1976). O interesse por *S. cerevisiae* como um patógeno oportunista é recente e existem poucos estudos sobre a origem e mecanismos de infecção desta espécie (Murphy; Kavanagh, 1999; Hennequin et al., 2001).

Assim, com base nos resultados obtidos neste estudo, verificou-se que é imprescindível a adoção de medidas de educação e prevenção em saúde bucal direcionada as crianças com AF. Apesar dos valores das contagens dos principais microrganismos cariogênicos (EGM e lactobacilos) e análise salivar (fluxo e capacidade tampão) não terem diferido do grupo controle, encontraram-se em níveis críticos fazendo com que a maior parte do grupo de estudo apresentasse risco de cárie alto e muito alto. A terapia com penicilina parece não interferir na contagem de

bactérias cariogênicas, pois as diferenças não foram significativas quando comparadas entre os grupos de estudo e controle.

Entretanto, com relação à contagem de leveduras, o número de UFC/mL de saliva foi significativamente maior nas crianças com AF o que sugere que a terapia com penicilina pode ser a responsável pelo aumento da colonização bucal por leveduras nesses pacientes, devido ao desequilíbrio da microbiota bucal pela sua ação possivelmente sobre as demais bactérias bucais. A prevalência de leveduras na cavidade bucal de crianças com AF, associada aos fatores predisponentes decorrentes da própria doença, pode colocar esses pacientes em situação de risco para o desenvolvimento de infecções fúngicas locais e/ou sistêmicas.

A cavidade bucal, em qualquer indivíduo, deve ser vista como parte do ser humano como um todo, influenciando diretamente na qualidade de vida do indivíduo. Pacientes com doenças sistêmicas devem ser vistos com atenção, como no caso dos pacientes com AF, cabendo aos profissionais da área da saúde (cirurgiões-dentistas e médicos) a tarefa de conscientizá-los sobre a importância dos cuidados com higiene bucal e suas implicações na saúde sistêmica, objetivando a melhora da qualidade de vida global. No caso das crianças com AF as medidas de conscientização devem ser voltadas não somente as crianças diretamente, mas especialmente aos responsáveis, pois o envolvimento de ambos é fundamental para que haja a mudança dos hábitos pré-existentes.

## 7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos, concluímos que:

- a) O risco de cárie de crianças com AF não diferiu significativamente do grupo controle, sendo que ambos os grupos apresentaram risco alto e muito alto;
- b) Os níveis salivares de leveduras foram significativamente mais elevados no grupo AF em relação ao grupo controle.

## 8 REFERÊNCIAS\*

Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5721-32.

Abey T, Krockel L, Hill C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int J Food Microbiol.* 1995;28(2):169-85.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.

Aguilera Galaviz LA, Premoli G, Gonzalez A, Rodriguez RA. Caries risk in children: determined by levels of mutans streptococci and *Lactobacillus*. *J Clin Pediatr Dent.* 2005;29(4):329-33.

Almeida Júnior AA, Ramos TM, Novais SMA, Grinfeld S, Fortes TMV, Pereira MAS. Relação entre a preferência por açúcar e a cárie dentária em gestantes do município de Aracajú – SE. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2005;5(1):59-64.

Almeida RVD, Padilha WWN, Pereira MSV, Sampaio TPD. Avaliação de teste salivar microbiológico colorimétrico no risco à cárie dentária. *Rev Bras Ciênc Saúde.* 2002;6(3):259-68.

Anderson MH, Bales DJ, Omnell KA. Modern management of dental caries: the cutting edge is not the dental bur. *J Am Dent Assoc.* 1993;124(6):36-44.

---

\* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Aucott JN, Fayen J, Grossnicklas H, Morrissey A, Lederman MM, Salata RA. Invasive infection with *Saccharomyces cerevisiae*: report of three cases and review. Rev Infect Dis. 1990;12(3):406-11.

Badet MC, Richard B, Dorignac G. An *in vitro* study of the pH-lowering potential of salivary lactobacilli associated with dental caries. J Appl Microbiol. 2001;90(6):1015-8.

Baglie S, Del Ruenis AP, Motta RH, Baglie RC, Franco GC, Franco LM, et al. Plasma and salivary amoxicillin concentrations and effect against oral microorganisms. Int J Clin Pharmacol Ther. 2007;45(10):556-62.

Baldani MH, Narvai PC, Antunes JLF. Cárie dentária e condições sócio-econômicas no Estado do Paraná, Brasil, 1996. Cad Saúde Pública. 2002;18(3):755-63.

Bandeira FMGC, Bezerra MAC, Santos MNN, Gomes YM, Araújo AS, Abath FGC. Importância dos programas de triagem para o gene da hemoglobina S. Rev Bras Hematol Hemoter. 2007;29(2):179-84.

Bandeira FMGC, Leal MC, Souza RR, Furtado VC, Gomes YM. Diagnóstico da hemoglobina S: análise de solubilidade com a eletroforese em pH alcalino e ácido no período neonatal. Rev Bras Saúde Matern Infant. 2003;3(3):265-70.

Bartels HA, Blechman H. Survey of yeast population in saliva and an evaluation of some procedures for identification of *Candida albicans*. J Dent Res 1962;41(6):1386-90.

Beighton D, Brailsford S, Samaranayake LP, Brown JP, Ping FX, Grant-Mills D, et al. A multi-country comparison of caries-associated microflora in demographically diverse children. Community Dent Health. 2004;21:96-101.

Beighton D, Brailsford SR. Lactobacilli and actinomyces: their role in the caries process. In: Stösser L, editor. Berlin: Quintessenz; 1998. p. 130-6.

Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Oral anatomy, histology and embryology. New York: Mosby; 2002.

Bertolini P. Contribuição ao estudo taxonômico de leveduras isoladas de canais radiculares de dentes humanos [tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba (SP), Universidade de Campinas – UNICAMP; 1964.

Beutler E. The sickle cell diseases and related disorders. New York: McGraw-Hill; 1995.

Bilavsky E, Eliahou R, Keller N, Yarden-Bilavsky H, Harel L, Amir J. Effect of benzathine penicillin treatment on antibiotic susceptibility of viridans streptococci in oral flora of patients receiving secondary prophylaxis after rheumatic fever. J Infect. 2008;56(4):244-8.

Birman EG. *Candida* e candidoses. In: Tommasi MH. Diagnóstico em patologia bucal. São Paulo: Pancast; 2002. p.198-9.

Bitarões EL, Oliveira BM, Viana MB. Compliance with antibiotic prophylaxis in children with sickle cell anemia: a prospective study. J Pediatr. 2008;84(4):316-22.

Bouza E, Muñoz P. *Saccharomyces cerevisiae*: el fin de la inocencia. Rev Esp Quimioterap. 2004;17:227-31.

Braga JAP. Medidas gerais no tratamento das doenças falciformes. Rev Bras Hematol Hemoter. 2007;29(3):233-8.

Bretas LP, Rocha ME, Vieira MS, Rodrigues. Fluxo salivar e capacidade tamponante da saliva como indicadores de susceptibilidade à doença cárie. Pesq Bras Odontoped Clin Integr. 2008;8(3):289-93.

Buischi YP. Promoção de saúde bucal na clínica odontológica. São Paulo: Artes Médicas EAP – APCD; 2000.

Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. N Eng J Med. 1997;337(11):762-9.

Burt BA, Eklund SA, Morgan KJ, Larkin FE, Guire KE, Brown LO, et al. The effects of sugars intake and frequency of ingestion on dental caries increment in a three-year longitudinal study. J Dent Res. 1988;67(11):1422-9.

Burt BA, Pai S. Sugar consumption and caries risk: a systematic review. J Dent Educ. 2001;65(10):1017-23.

Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *C. albicans*. Trends Microbiol. 2001;9(7):327-35.

Calderon-Santoyo M, Mendoza-Garcia PG, Garcia-Alvarado MA, Escudero-Abarca BI. Effect of physical factors on the production of bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* ITV 26. J Ind Microbial Biotechnol. 2001;26:191-5.

Campos JADB, Giro EMA, Orrico SRP, Oliveira APC, Lorena SM. Correlação entre a prevalência de cárie e a utilização de medicamentos em pacientes com necessidades especiais institucionalizados e não institucionalizados. Salusvita. 2006;25(1):35-42.

Cannon RD, Nand AK, Jenkinson HF. Adherence of *Candida albicans* to human salivary components adsorbed to hydroxylapatite. Microbiology. 1995;141:213-19.

Cardoso GL, Guerreiro JF. African gene flow to north Brazil as revealed by HBB\*S gene haplotype analysis. Am J Hum Biol. 2006;18(1):93-8.

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.

Chayakul P, Ortiwakul R, Yipintsoi T, Ingviya N. Viridans streptococci in the oral flora of the patients at risk for infective endocarditis: species and penicillin susceptibilities. *J Med Assoc Thai*. 2002;85(7):825-30.

Chertow GM, Mercantonio ER, Wells RG. *Saccharomyces cerevisiae* emphysema in a patient with esophago pleural fistula complicating variceal scleropathy. *Chest*. 1991;99:1518-9.

Cimolai N, Gill MJ, Church D. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: case report and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1987;8(2):113-7.

Como JA, Dismukes WE. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N Engl J Med*. 1994;330(4):263-72.

Cortelli SC, Chaves MGAM, Faria IS, Landucci LF, Oliveira LD, Scherma AP, et al. Avaliação da condição bucal e do risco de cárie de alunos ingressantes em curso de odontologia. *PGR-Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos*. 2002;5(1):35-42.

Cox GM. A study of oral pain experience in sickle cell patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1984;58(1):39-41.

da Fonseca M, Oueis HS, Casamassimo PS. Sickle cell anemia: a review for the pediatric dentist. *Pediatr Dent*. 2007;29(2):159-69.

Davenport ES. Caries in the preschool child: aetiology. *J Dent*. 1990;18(6):300-3.

de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DM. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol*. 2006; 51(11):1024-8.

de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DM. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. Arch Oral Biol. 2006;51(11):1024-8.

De Lorenzo JL, De Lorenzo A. Etiologia da cárie dental: base da prevenção atual. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN, editors. Odontopediatria: prevenção. São Paulo: Editora Artes Médicas; 2002. p. 215-34.

De Lorenzo JL. Importância da utilização da sacarose na cárie dental – Parte I. Rev APCD. 1998;42:362-4.

De Melo AC, Dornelas-Ribeiro M, De Souza EP, Macrae A, Fracalanza SE, Vermelho AB. Peptidase profiles from non-*albicans* *Candida* spp. isolated from the blood of a patient with chronic myeloid leukemia and another with sickle cell disease. FEMS Yeast Res. 2007;7(6):1004-12.

de Repentigny L, Lewandowski D, Jolicoeur P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. Clin Microbiol Rev. 2004;17(4):729-59.

Delgado A, Noé Arroyo López F, Brito D, Peres C, Fevereiro P, et al. Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 172b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. J Biotechnol. 2007;130:193-201.

DePaola PF, Soparkar PM, Tavares M, Kent RL Jr. Clinical profiles of individuals with and without root surface caries. Gerodontology. 1989;8(1):9-15.

Di Nuzzo DVP, Fonseca SF. Anemia falciforme e infecções. J Pediatr. 2004;80(5):347-54.

Disney JA, Graves RC, Stamm JW, Bohannon HM, Abernathy JR, Zack DD. The University of North Carolina caries risk assessment study: further developments in caries risk prediction. Community Dent Oral Epidemiol. 1992;20(2):64-75.

Doern GV, Ferraro MJ, Brueggemann AB, Buoff KL. Emergence of high rates of antimicrobial resistance among viridans group streptococci in the United States. *Antimicrobial Agents Chemother.* 1996;40(4):891-4.

Donnelly SM, Sullivan DJ, Shanley DB, Coleman DC. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. *Microbiology.* 1999;145:1871-82.

Dougherty SH, Simmons RL. Postoperative peritonitis caused by *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Surg.* 1982;117(2):248-9.

Dreizen S. Oral candidiasis. *Am J Med.* 1984;77(4D):28-33.

Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J.* 1992;172(8):305-12.

Edwardsson S. Bacteriological studies on deep areas of carious dentine. *Odontol Revy Suppl.* 1974;32:1-143.

Embury SH. Anemia falciforme e hemoglobinopatias associadas. In: Bennett JC, Plum F, editors. *Cecil tratado de medicina interna*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.

Ercan E, Dülgergil CT, Yildirim I, Dalli M. Prevention of maternal bacterial transmission on children's dental caries development: 4 year results of a pilot study in a rural child population. *Arch Oral Biol.* 2007;52(8):748-52.

Ericsson Y. Clinical investigation on the salivary buffering action. *Acta Odontol Scand.* 1959;17:131-65.

Ertugrul F, Elbek-Cubukcu C, Sabah E, Mir S. The oral health status of children undergoing hemodialysis treatment. *Turk J Pediatr.* 2003;45(2):108-13.

Fanello S, Bouchara JP, Sauteron M, Delbos V, Parot E, Marot-Leblond A, et al. Predictive value of oral colonization by *Candida* yeasts for the onset of a nosocomial infection in elderly hospitalized patients. J Med Microbiol. 2006;55(2):223-8.

Farsi N. Dental caries in relation to salivary factors in Saudi population groups. J Contemp Dent Pract. 2008;9(3):16-23.

Ferraz MHC, Murao M. Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e após o sexto mês de vida. Rev Bras Hematol Hemoter. 2007;29(3):218-22.

Fleming P, Feigal RJ, Kaplan EL, Liljemark WF, Little JW. The development of penicillin-resistant oral streptococci after repeated penicillin prophylaxis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1990;70(4):440-4.

Flório FM. Padrão de colonização por estreptococos do grupo *mutans* em crianças submetidas ou não a programa de promoção de saúde bucal [tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba (SP), Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP; 2003.

Fonseca PBB, Braga JAP, Machado AMO, Brandileone MCC, Farhat CK. Colonização nasofaríngea pelo *Streptococcus pneumoniae* em crianças com doença falciforme usando penicilina profilática. J Pediatr. 2005;81(2):149-54.

Fontana M, Zero DT. Assessing patients' caries risk. J Am Dent Assoc. 2006;137(9):1231-9.

Fontes GC, Amaral PFF, Coelho MAZ. Produção de biossurfactante por levedura. Quim Nova. 2008;31(8):2091-9.

Fosdick LS, Hansen HL. The reductase activity of various mouth organisms. J Am Dent Ass. 1937;24:14-45.

Fox PC, van der Ven PF, Sonies BC, Weiffenbach JM, Baum BJ. Xerostomia: evaluation of a symptom with increasing significance. JADA. 1985;110(4):519-25.

Fukuda JT, Sonis AL, Platt OS, Kurth S. Acquisition of mutans streptococci and caries prevalence in pediatric sickle cell anemia patients receiving long-term antibiotic therapy. Pediatr Dent. 2005;27(3):186-90.

Gabris K, Nagy G, Madlena M, Denes Z, Marton S, Keszthelyi G, et al. Associations between microbiological and salivary caries activity tests and caries experience in Hungarian adolescents. Caries Res. 1999;33(3):191-5.

Gay JC, Phillips JAIII, Kazazian HHJr. Hemoglobinopathies and thalassemias. New York: Churchill Livingstone; 1997.

Galiza Neto GC, Pitombeira MS. Aspectos moleculares da anemia falciforme. J Bras Patol Med Lab. 2003;39(1):51-6.

Gizani S, Vinckier F, Declerck D. Caries pattern and oral health habits in 2- to 6-year-old children exhibiting differing levels of caries. Clin Oral Invest. 1999;3(1):35-40.

Glass RL. The occurrence of yeasts in the saliva of children. Acta Odont Scand. 1985;43(6):381-7.

Gomes PR, Costa SC, Cypriano S, Sousa MLR. Paulínia, São Paulo, Brasil: situação da cárie dentária com relação às metas OMS 2000 e 2010. Cad Saúde Pública. 2004;20(3):866-70.

Gómez-Chiari M, Puigbert JT, Aramburu JO. Drepanocytosis: experiência de um centro. An Pediatr. 2003;58(2):95-9.

Grimoud AM, Lodter JP, Marty N, Andrieu S, Bocquet H, Linas MD, et al. Improved oral hygiene and *Candida* species colonization level in geriatric patients. Oral Dis. 2005;11(3):163-9.

Hägg U, Kaveewatcharanont P, Samaranayake YH, Samaranayake LP. The effect of fixed orthodontic appliances on the oral carriage of *Candida* species and Enterobacteriaceae. Eur J Orthod. 2004;26(6):623-9.

Hankins JS, Ware RE, Rogers ZR, Wynn LW, Lane PA, Scott JP, et al. Long-term hydroxyurea therapy for infants with sickle cell anemia: the HUSOFT extension study. Blood. 2005;106(7):2269-75.

Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. Clin Microbiol Rev. 1995;8(4):462-78.

Helm S, Helm T. Correlation between caries experience in primary and permanent dentition in birth-cohorts 1950-70. Scand J Dent Res. 1990;98(3):225-7.

Hennequin C, Thierry A, Richard GF, Lecointre G, Nguyen HV, Gaillardin C, et al. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. J Clin Microbiol. 2001;39(2):551-9.

Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. J Prosthet Dent. 2001;85(2):162-9.

Iannone R, Ohene-Frempong K, Fuchs EJ, Casella JF, Chen AR. Bone marrow transplantation for sickle cell anemia: progress and prospects. Pediatr Blood Cancer. 2005;44(5):436-40.

Ishihara K, Miyakawa H, Hasegawa A, Takazoe I, Kawai Y. Growth inhibition of *Streptococcus mutans* by cellular extracts of human intestinal lactic acid bacteria. Infect Immun. 1985;49(3):692-4.

Jensen DP, David MD, Smith MD. Fever of unknown origin secondary to brewer's yeast ingestion. Arch Intern Med. 1976;136(3):332-3.

Kelleher M, Bishop K, Briggs P. Oral complications associated with sickle cell anemia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1996;82(6):225-8.

Khöler B, Bratthall D. A practical method to facilitate the estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. J. Clin. Microbiol. 1979;9(5):584-8.

Kimura EM, Oliveira DM, Jorge SEDC, Abreu CF, Albuquerque DM, Costa FF, et al. Identificação e caracterização de variantes novas e raras da hemoglobina humana. Rev Bras Hematol Hemoter. 2008;30(4):316-9.

Klinke T, Kneist S, de Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Forster A, et al. Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. Caries Res. 2009;43(2):83-91.

Koga-Ito CY, Jorge AOC. Microbiologia da cárie dentária. In: Jorge AOC. Microbiologia Bucal. São Paulo: Livraria Editora Santos; 2007. p. 71-88.

Koga-Ito CY, Unterkircher CS, Watanabe H, Martins CA, Vidotto V, Jorge AOC. Caries risk tests and salivary levels of immunoglobulins to *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in mouthbreathing syndrome patients. Caries Res. 2003;37(1):38-43.

Krasse B. Interpretation and use of microbiologic findings in dental caries. Oral Microbiol Immunol. 1986;1:85-6.

Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infect. 2002;50(4):243-60.

Krumwiede E. Penicillin resistance of nonhemolytic streptococci from rheumatic children receiving prophylactic penicillin. Pediatrics. 1949;4(5):634-42.

Kwon-Chung K, Bennett JE. *Saccharomyces*. In: Kwon-Chung JJ, Bennet JE, editors. Medical mycology. Philadelphia: Lea and Febiger; 1992. p. 772-3.

Laguardia J. No fio da navalha: anemia falciforme, raça e as implicações no cuidado à saúde. Estudos Feministas. 2006;14(1):243-62.

Laurence B, Reid BC, Katz RV. Sick cell anemia and dental caries: a literature review and pilot study. *Spec Care Dentist*. 2002;22(2):70-4.

Leites ACBR, Pinto MB, Sousa ER. Aspectos microbiológicos da cárie dental. *Salusvita*. 2006;25(2):135-48.

Leone CW, Oppenheim FG. Physical and chemical aspects of saliva as indicators of risk for dental caries in humans. *J Dent Educ*. 2001;65(10):1054-62.

Li Y, Wang W. Predicting caries in permanent teeth from caries in primary teeth: an eight-year cohort study. *J Dent Res*. 2002;81(8):561-6.

Lima JEO. Cárie dentária: um novo conceito. *Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial*. 2007;12(6):119-30.

Loggetto SR, Pellegrini-Braga JA, Costa-Carvalho BT, Solé D. Alterações imunológicas em pacientes com anemia falciforme. *Rev Bras Alerg Immunopatol*. 1999;22:77-82.

Lorenzo JL, Lorenzo A. Cariologia: Etiopatogenia da cárie dental. In: Lorenzo JL, editor. *Microbiologia para o estudante de Odontologia*. São Paulo: Editora Atheneu; 2004. p. 87-115.

Lorenzo JL, Lorenzo A. Etiologia da cárie dental: Base da prevenção atual. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. *Odontopediatria: Prevenção*. São Paulo: Editora Artes Médicas; 2002. p. 215-34.

Lucas VS, Roberts GJ. Oro-dental health in children with chronic renal failure and after renal transplantation: a clinical review. *Pediatr Nephrol*. 2005;20(10):1388-94.

Magnus SA, Hambleton IR, Moosdeen F, Serjeant GR. Recurrent infections in homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child*. 1999;80(6):537-41.

Mähnss B, Stehr F, Schäfer W, Neuber K. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses*. 2005;48(1):55-61.

Makihira S, Nikawa H, Tamagami M, Hamada T, Nishimura H, Ishida K, et al. Bacterial and *Candida* adhesion to intact and denatured collagen in vitro. *Mycoses*. 2002;45(9/10):389-92.

Makras L, De Vuyst L. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *Int Dairy J*. 2006;16:1049-57.

Manfredini V, Castro S, Wagner S, Benfato MS. A fisiopatologia da anemia falciforme. *Infarma*. 2007;19(1/2):3-6.

Manji F, Fejerskov O. Dental caries in developing countries in relation to the appropriate use of fluoride. *J Dent Res*. 1990;69:733-41.

Manzella JP, Shaffer S, Agarwal N, Kellogg JA. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a multiply traumatized patient. *J Trauma*. 1989;29(1):129-30.

Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC, Roberts GJ, Beighton D. The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res*. 2001;35(6):397-406.

Mariri BP, Levy SM, Warren JJ, Bergus GR, Marshall TA, Broffitt B. Medically administered antibiotics, dietary habits, fluoride intake and dental caries experience in the primary dentition. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2003;31(1):40-51.

Mateos A. Brasileiros comem cada vez mais e com pior qualidade. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 1999;53(1):8-20.

Mattos-Graner RO, Zelante F, Line RC, Mayer MP. Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-year-old Brazilian children. *Caries Res*. 1998;32(5):319-23.

Mayer MPA, Lorenzo JL. Avaliação do risco de cárie dental. In: Lorenzo JL, editor. Microbiologia para o estudante de Odontologia. São Paulo: Editora Atheneu; 2004. p. 117-25.

McCusker JH, Clemos KV, Stevens DA, Davis RW. *Saccharomyces cerevisiae* virulence phenotype as determined with CD-1 mice is associated with the ability to grow at 42°C and form pseudohyphae. Infect Immun. 1994;62:5447-55.

Meurman JH, Antila H, Korhonen A, Salminen S. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103) on the growth of *Streptococcus sobrinus*, *in vitro*. Eur J Oral Sci. 1995;103(4):253-8.

Michalek SM, Hirasawa M, Hiroshi K, Kuniyasu O, Mcghee JR. Oral ecology and virulence of *Lactobacillus casei* and *Streptococcus mutans* in gnotobiotic rats. Infect Immun. 1981;33(3):690-6.

Ministério da Saúde. Manual de saúde bucal na doença falciforme. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

Moalic E, Gestalin A, Quinio D, Gest PE, Zerilli A, Le Flohic AM. The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. Caries Res. 2001;35(2):149-55.

Mokaddas EM, Salako NO, Philip L, Rotimi VO. Discrepancy in antimicrobial susceptibility test results obtained for oral streptococci with the Etest and agar dilution. J Clin Microbiol. 2007;45(7):2162-5.

Mousinho-Ribeiro RC, Cardoso GL, Sousa IEL, Martins PKC. Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. Rev Bras Hematol Hemoter. 2008;30(2):136-41.

Murao M, Ferraz MHC. Traço falciforme: heterozigose para hemoglobina S. Rev Bras Hematol Hemoter. 2007;29(3):223-5.

Murphy A, Kavanagh K. Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen. Implications for biotechnology. *Enzyme Microb Technol*. 1999;25:551-7.

Nagler RM. Salivary glands and the aging process: mechanistic aspects, health-status and medicinal-efficacy monitoring. *Biogerontology*. 2004;5(4):223-33.

Naiman RA, Barrow JG. Penicillin-resistant bacteria in the mouths and throats of children receiving continuous prophylaxis against rheumatic fever. *Ann Intern Med*. 1963;58:768-72.

Navazesh M. Salivary gland hypofunction in elderly patients. *J Calif Dent Assoc*. 1994;22(3):62-8.

Newbrum E. *Cariologia*. São Paulo: Santos; 1988.

Nielsen H, Stenderup J, Bruun B. Fungemia with *Saccharomycetaceae*. Report of four cases and review of the literature. *Scand J Infect Dis*. 1990;22(5):581-4.

Nik-Hussein NN, Razak IA, Karim MN. An analysis of sugar content of commonly used pediatric liquid medicines--its relevance to dentistry. *Singapore Dent J*. 1988;13(1):24-6.

Norris CF, Mahannah SR, Smith-Whitley K, Ohene-Frempong K, McGowan KL. Pneumococcal colonization in children with sickle cell disease. *J Pediatr*. 1996;129(6):821-7.

O'Rourke CA, Hawley GM. Sickle cell disorder and orofacial pain in Jamaican patients. *Br Dent J*. 1998;185(2):90-2.

Odds FC. Factors that predispose the host to candidiasis. In: Odds FC, editor. *Candida and candidoses*. London: Baillière Tindall; 1988. p. 93-114.

Okafor LA, Nonnoo DC, Ojehanon PI, Aikhionbare O. Oral and dental complications of sickle cell disease in Nigerians. *Angiology*. 1986;37(9):672-5.

O'Rourke CA, Hawley GM. Sickle cell disorder and orofacial pain in Jamaican patients. *Br Dent J*. 1998 ;185(2):90-2.

Owen OW. A study of bacterial counts (lactobacilli) in saliva related to orthodontic appliances. *Amer J Orthodont* 1949;35(9):672-8.

Pante-de-Sousa G, Mousinho-Ribeiro RC, Santos EJM, Zago MA, Guerreiro JF. Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: the combined effects of slave trade and internal migrations. *Genet Mol Biol*. 1998;21(4):427-30.

Passos GM. Processos carióticos micóticos: técnicas de defesa [tese]. Recife: Faculdade de Odontologia (PE), Universidade do Recife; 1961.

Pegelow CH, Armstrong FD, Light S, Toledano SR, Davis J. Experience with the use of prophylactic penicillin in children with sickle cell anemia. *J Pediatr*. 1991;118(5):736-8.

Peres KGA, Bastos JRM, Latorre MRDO. Severidade de cárie em crianças e relação com aspectos sociais e comportamentais. *Rev Saúde Pública*. 2000;34(4):402-8.

Petersen PE. Dental health among workers in a Danish chocolate factory. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1983;11(6):337-41.

Petersson GH. Assessing caries risk--using the Cariogram model. *Swed Dent J Suppl*. 2003;158:1-65.

Pfaller MA, Diekema DJ, Colombo AL, Kibbler C, Ng KP, Gibbs DL, et al. *Candida rugosa*, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol*. 2006;44(10):3578-82.

Pienihäkkinen K. Caries prediction through combined use of incipient caries lesions, salivary buffering capacity, lactobacilli and yeasts in Hungary. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1987;15(6):325-8.

Pienihäkkinen K. Salivary lactobacilli and yeasts in relation to caries increment. Annually repeated measurements versus a single determination. *Acta Odontol Scand*. 1988;46(1):57-62.

Pinheiro LS, Gonçalves RP, Tomé CAS, Alcântara AEE, Marques ARC, Silva MM. Prevalência de hemoglobina S em recém-nascidos de Fortaleza: importância da investigação neonatal. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2006;28(2):122-5.

Piratininga JL. Manifestações Bucais das Anemias Falciformes [tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia de São Paulo (SP), Universidade de São Paulo – USP; 2000.

Prieto-Prieto J, Calvo A. Microbiological basis of oral infections and sensitivity to antibiotics. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2004;9:11-4.

Rada RE, Bronny AT, Hasiakos PS. Sick cell crisis precipitated by periodontal infection: report of two cases. *J Am Dent Assoc*. 1987;114(6):799-801.

Ramalho AS, Giraldi T, Magna LA. Estudo genético-epidemiológico da hemoglobina S em uma população do Sudeste do Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(2):89-94.

Redding-Lallinger R, Knoll C. Sick cell disease – Pathophysiology and treatment. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2006;36:346-76.

Rego MA, Jorge AOC. Risco de cárie: Aspectos microbiológicos. In: Jorge AOC, editor. *Microbiologia Bucal*. São Paulo: Editora Santos; 2007. p. 89-98.

Rogosa M, Mitchell JA, Wieman RF. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. *J Dent Res*. 1951;30(5):682-9.

Rosa CA, Novak FR, Almeida JAG, Mendonça-Hagler LC, Hagler AN. Leveduras de leite humano coletado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Rev Microbiol. 1990;21(4):361-3.

Rosa LJR, Magalhães MHCG. Aspectos gerais e bucais da anemia falciforme e suas implicações no atendimento odontológico. Rev Assoc Paul Cir Dent. 2002;56(5):377-81.

Russell JI, MacFarlane TW, Aitchison TC, Stephen KW, Burchell CK. Prediction of caries increment in Scottish adolescents. Community Dent Oral Epidemiol. 1991;19(2):74-7.

Sahgal J, Sood PB, Raju OS. A comparison of oral hygiene status and dental caries in children on long term liquid oral medications to those not administered with such medications. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2002;20(4):144-51.

Samaranayake LP, Hughes A, Weetman DA, MacFarlane TW. Growth and acid production of *Candida* species in human saliva supplemented with glucose. J Oral Pathol. 1986;15(5):251-4.

Sampaio TPD, Padilha WWN, Lira CC, Leite JCL, Santos Filho L. Reprodutibilidade de teste salivar para microbiota cariogênica. Pesq Bras Odontoped Clin Integr. 2003;3(2):65-9.

Savini V, Catavittello C, Manna A, Talia M, Febbo F, Balbinot A, et al. Two cases of vaginitis caused by itraconazole-resistant *Saccharomyces cerevisiae* and a review of recently published studies. Mycopathologia. 2008;166(1):47-50.

Scherma AP, Santos DVO, Jorge AOC, Rocha RF. Presença de *Candida* spp. na cavidade bucal de lactentes durante os primeiros quatro meses de vida. Cienc Odontol Bras. 2004;7(3):79-86.

Scherma AP. Efeitos da penicilina, metronidazol e tetraciclina na recuperação de *Candida albicans* e na candidose bucal em ratos [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP), Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2005.

Schou L, Uitenbroek D. Social and behavioural indicators of caries experience in 5-year-old children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1995;23(5):276-81.

Sethi N, Mandell W. *Saccharomyces* fungemia in a patient with AIDS. *NY State J Med.* 1988;88(5):278-9.

Silla LMR. Doença falciforme: um grave e desconhecido problema de saúde pública no Brasil. *J Pediatr.* 1999;75(3):167-71.

Silva JS, Silva FDSCM, Forte FDS, Sampaio SC. Prevalência de cárie e indicadores de risco em crianças de 2 a 6 anos na clínica de Odontologia Preventiva – UFPB. *Revista Odonto Ciência.* 2006;21(51):17-21.

Simark-Mattsson C, Jonsson R, Emilson CG, Roos K. Final pH affects the interference capacity of naturally occurring oral *Lactobacillus* strains against mutans streptococci. *Arch Oral Biol.* 2009;54(6):602-7.

Siqueira JF Jr, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(5):632-41.

Siudikiene J, Machiulskiene V, Nyvad B, Tenovuo J, Nedzelskiene I. Dental caries and salivary status in children with type 1 diabetes mellitus, related to the metabolic control of the disease. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114(1):8-14.

Spencer 3rd WH, Thornsberry C, Moody MD, Wenger NK. Rheumatic fever chemoprophylaxis and penicillin-resistant gingival organisms. *Ann Intern Med.* 1970;73(5):683-7.

Sprunt K, Redman W, Leidy G. Penicillin resistant alpha streptococci in pharynx of patients given oral penicillin. *Pediatrics.* 1968;42(6):957-68.

Sreebny LM. Sugar and human dental caries. *World Rev Nutr Diet.* 1982;40:19-65.

Sziegoleit F, Weidner N, Sziegoleit A, Wetzel W. Oral and gastro-intestinal colonization by *Candida*. Dtsch Zahnärztl Z. 2002;57:349-52.

Tabak LA. A revolution in biomedical assessment: the development of salivary diagnostics. J Dent Educ. 2001;65(12):1335-9.

Tawfik OW, Papasian CJ, Dixon AY, Potter LM. *Saccharomyces cerevisiae* pneumonia in a patient with acquired immune deficiency síndrome. J Clin Microbiol. 1989;27(7):1689-91.

Taylor LB, Nowak AJ, Giller RH, Casamassimo PS. Sick cell anemia: a review of the dental concerns and a retrospective study of dental bone changes. Spec Care Dent. 1995;15(1):38-42.

Ten Cate AR. Oral histology: development, structure and function. St. Louis: Mosby; 1998.

Tenovuo J, Lagerlöf F. Saliva. In: Thylstrup A, Fejerskov O. Textbook of clinical cariology. Copenhagen: Munksgaard; 1994.

Theilade E, Birkhed D. Dieta e cárie. In: Thylstrup A, Fejerskov O, editors. Tratado de Cariologia. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 1988. p. 117-54.

Thenisch NL, Bachmann LM, Imfeld T, Leisebach Minder T, Steurer J. Are mutans streptococci detected in preschool children a reliable predictive factor for dental caries risk? A systematic review. Caries Res. 2006;40(5):366-74.

Thylstrup A, Fejerskov O. Cariologia Clínica. São Paulo: Editora Santos; 1994.

Twetman S, Fritzson B, Jensen B, Hallberg U, Stahl B. Pre- and post-treatment levels of salivary mutans streptococci and lactobacilli in pre-school children. Int J Paediatr Dent. 1999;9(2):93-8.

Van Houte J, Sansone C, Joshipura K, Kent R. Mutans streptococci and non-mutans streptococci acidogenic at low pH, and in vitro acidogenic potential of dental plaque in two different areas of the human dentition. *J Dent Res*. 1991;70(12):1503-7.

van Houte J. Microbiological predictors of caries risk. *Adv Dent Res*. 1993;7(2):87-96.

Vanobbergen J, Martens L, Lesaffre E, Boagerts K, Declerck D. Assessing risk indicators for dental caries in the primary dentition. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2001;29(6):424-34.

Verrips GH, Kaisbeek, H, Eijkman MAJ. Ethnicity and maternal education as risk indicators for dental caries, and the role of dental behaviour. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1993;21(4):209-14.

Watanabe AM, Pianovski MAD, Neto JZ, Lichtvan LCL, Chautard-Freire-Maia EAC, Domingos MT, et al. Prevalência da hemoglobina S no Estado do Paraná, Brasil, obtida pela triagem neonatal. *Cad Saúde Pública*. 2008;24(5):993-1000.

Weyne SC, Harari SG. Cariologia: implicações e aplicações clínicas. In: Baratieri LN. *Odontologia Restauradora: fundamentos e possibilidades*. São Paulo: Santos; 2001. p. 1-30.

Wilkins BS. The spleen. *Br J Haemat*. 2002;117(2):265-74.

Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003;36(4):223-8.

Zamaro PJA, Canalli AA, Júnior WAS, Domingos CRB. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à HbS. *J Bras Patol Med Lab*. 2002;38(4):261-6.

Zarkowsky HS, Gallagher D, Gill FM, Wang WC, Falletta JM, Lande WM, et al. Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia. A randomized trial. *N Engl J Med*. 1986;314(25):1593-9.

Zero D, Fontana M, Lennon AM. Clinical applications and outcomes of using indicators of risk in caries management. J Dent Educ. 2001;65(10):1126-32.

Zero D. Sugars: the arch criminal?. Caries Res 2004;38(3):277-85.

Zhang Q, Bian Z, Fan M, van Palenstein Helderman WH. Salivary mutans streptococci counts as indicators in caries risk assessment in 6-7-year-old Chinese children. J Dent. 2007;35(2):177-80.

## APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido (UNESP)

### Termo de consentimento livre e esclarecido

Eu, Bruno Mello de Matos, cirurgião - dentista, sob a orientação da Prof. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Yumi Koga Ito, portador do CPF 307.934.858-35, RG 32.481.320-X, CRO 90.633; estabelecido na Rua Elisa Costa Santos 208, apt. 21, CEP 12.245-380, na cidade de São José dos Campos, cujo telefone de contato (12) 3943 7493, irei desenvolver uma pesquisa cujo título é “Avaliação da microbiota cariogênica, fluxo e capacidade tampão salivar de pacientes pediátricos com anemia falciforme”.

O objetivo deste estudo é avaliar a presença de microrganismos cariogênicos na boca (estreptococos do grupo *mutans*, lactobacilos e leveduras) através da coleta não invasiva e indolor, de saliva em pacientes com anemia falciforme, e indivíduos controle. A coleta do material da boca será feita através da mastigação de um pedaço de parafina durante 5 minutos e durante esse período o material deverá ser depositado no coletor que estamos fornecendo. Esse procedimento não traz nenhum risco à sua saúde.

O Sr (a) tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas e sobre o andamento do trabalho. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, situada na Av. Eng. Francisco José Longo 777, CEP 12.245-000, em São José dos Campos, Fone: 3947 9033 e comunique-se com a coordenadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli Carvalho Mutti Naressi. Informo que será garantida a liberdade de retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela colaboração.

### Termo de consentimento livre e esclarecido

Acredito ter sido esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Avaliação da microbiota cariogênica, fluxo e capacidade tampão salivar de pacientes pediátricos com anemia falciforme”, e concordo em participar sabendo quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, e que a minha participação não implicará em nenhuma despesa. Concordo em participar voluntariamente deste estudo e com a publicação anônima dos dados gerados por ele. Poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Endereço completo: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Assinatura do paciente

RG

**APÊNDICE B – Ficha clínica****Ficha Clínica**

Nome: \_\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_  
Nome do pai: \_\_\_\_\_ Escolaridade: \_\_\_\_\_  
Nome da mãe: \_\_\_\_\_ Escolaridade: \_\_\_\_\_  
Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_  
Local da Coleta: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_

**ANAMNESE - HISTÓRIA MÉDICA**

01. Está tomando algum remédio? ( ) Sim ( ) Não Qual? \_\_\_\_\_  
02. Faz uso de antibiótico? ( ) Sim ( ) Não Qual? \_\_\_\_\_  
03. É diabético? ( ) Sim ( ) Não  
04. Há alguma outra informação importante sobre sua saúde que não foi perguntado e que deseje comentar? \_\_\_\_\_

**ANAMNESE - HISTÓRIA DENTAL**

01. Já foi ao dentista alguma vez? ( ) Sim ( ) Não  
02. Faz refeições regulares (café da manhã, almoço e jantar)? ( ) Sim ( ) Não  
03. Ingere algum tipo de alimento entre as refeições? ( ) Sim ( ) Não  
Qual? \_\_\_\_\_  
04. Quantas vezes come doces ao dia? \_\_\_\_\_  
05. Escova os dentes? ( ) Sim ( ) Não  
Quantas vezes ao dia? \_\_\_\_\_

**EXAME CLÍNICO**

Lesões bucais presentes: \_\_\_\_\_

ceo-d/CPO-D: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE C – Termo de consentimento livre e esclarecido (UNIFESP)

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do projeto: "Avaliação da microbiota cariogênica, fluxo e capacidade tampão salivar de pacientes pediátricos com anemia falciforme".

O objetivo deste estudo é avaliar a presença de alguns microrganismos na boca (como leveduras, estreptococos e lactobacilos) através da coleta não invasiva e indolor de saliva estimulada em pacientes pediátricos com anemia falciforme, e indivíduos controle.

A coleta do material da boca será feita através da mastigação de parafina durante 5 minutos e durante este período este material deverá ser depositado no coletor que estamos fornecendo.

Este procedimento não resultará em nenhum desconforto ou risco para o paciente e nem benefício direto ao participante. Caso sejam constatadas lesões de cárie ou outras alterações bucais, a criança e o responsável serão encaminhados para os serviços públicos ou Faculdades de Odontologia da cidade de São Paulo.

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal é a Dra. Maria Stella Figueiredo, que pode ser encontrada no endereço: Rua Botucatu, 740 – 3º andar, 5579-1550. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – Cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@epm.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente, tendo o participante o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais do estudo.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Todos os pesquisadores deste projeto comprometem-se a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Avaliação da microbiota cariogênica, fluxo e capacidade tampão salivar de pacientes pediátricos com anemia falciforme".

Eu discuti com a Dra. Maria Stella Figueiredo sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concorro voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/Representante legal Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura da testemunha Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

(Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.)

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa**

  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
Av. Eng. Francisco José Langlo, 777 - Jd. São Dimas  
CEP 12201-970 - F. (12) 3947-9028  
Fax. (12) 3947-9010 / [susy@fodju.unesp.br](mailto:susy@fodju.unesp.br)



**CERTIFICADO**  
**Comitê de Ética em Pesquisa**  
**Envolvendo Seres Humanos**

**CERTIFICAMOS**, que o protocolo nº **082/2007-PH/CEP**, sobre “ **Avaliação da microbiota cariogênica, fluxo e capacidade tampão salivar de pacientes pediátricos com anemia falciforme**” , sob a responsabilidade de **CRISTIANE YUMI KOGA ITO** está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 16 de outubro de 2007.

**Profa. Dra. JANETE DIAS ALMEIDA**  
**Vice-Coordenadora do CEP/HUMANOS/FOSJC**

## ANEXO B – Alteração do Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 São Dimas CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9000 – FAX (12) 3947-9028 -



**Comitê de Ética em Pesquisa  
Envolvendo Seres Humanos**

São José dos Campos, 21 de maio de 2009

Ofício nº 034/09-CEP

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Prezado(a) Sr.(a)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                           | <b>CRISTIANE YUMI KOGA ITO</b>                                                                                        |
| <b>Projeto</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Avaliação da microbiota cariogênica, fluxo e capacidade tampão salivar de pacientes pediátricos com anemia falciforme |
| <b>PARECER</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                       |
| <p>Por solicitação da Pesquisadora, foi alterado o título do Projeto acima mencionado, passando a denominar-se <b>“Avaliação do risco de cárie e microbiota fúngica em pacientes pediátricos com anemia falciforme”</b>. Convalidando dessa forma o Protocolo nº 082/2007-PH/CEP de 16/10/2007</p> |                                                                                                                       |

Atenciosamente,

  
**Profa. Adjunto JANETE DIAS ALMEIDA**  
**Coordenadora**

## ANEXO C – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 30 de novembro de 2007.  
CEP 1735/07

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) MARIA STELLA FIGUEIREDO  
Co-Investigadores: Josefina A P Braga, Cristiane Yumi Koga Ito, Bruno Mello de Matos, Ana Paula de Almeida Lourenço  
Disciplina/Departamento: Hematologia e Hemoterapia/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
Patrocinador: Recursos Próprios.

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “**Avaliação da microbiota bucal em pacientes com anemia falciforme**”.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: intervenção diagnóstica.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Sem risco, sem procedimento invasivo.

OBJETIVOS: Investigar a microbiota cariogênica, fluxo salivar e capacidade tampão salivar de pacientes com anemia falciforme..

RESUMO: Participarão do estudo 40-50 pacientes de ambos os gêneros, com idades entre 4 a 6 anos, com anemia falciforme diagnosticadas clinicamente e por métodos laboratoriais, e em tratamento no ambulatório da Disciplina de Hematologia da UNIFESP. As crianças deverão estar sob antibioticoterapia com penicilina por um período mínimo de 6 meses. Para o grupo controle, serão selecionadas 40-50 crianças saudáveis com perfil semelhante ao grupo estudo, dentre os indivíduos atendidos nas clínicas da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, sem diagnóstico de anemia falciforme ou outras doenças sistêmicas, e que não tenham sido submetidas a tratamento com antibióticos ou antifúngicos nos últimos 60 dias. Será realizado anamnese e exame clínico da saúde geral e bucal. Será coletada saliva para determinação do fluxo salivar, da capacidade tampão da saliva, contagem de estreptococos do grupo mutans, contagens de lactobacilos, contagem de leveduras, identificação dos isolados de Candida spp e de estreptococos do grupo mutans..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Crianças com diagnóstico de anemia falciforme são submetidas à terapia antibiótica prolongada com penicilina. Estudos tem mostrado menor incidência de cárie e de streptococcus mutans neste pacientes, embora apresentem maiores índices de CPO-D ( dentes cariados, perdidos e restaurados). Este estudo visa avaliar a microbiota cariogênica e aspectos salivares destes pacientes..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos a serem realizados, apresentando carta de concordância das instituições e pesquisadores envolvidos..

TCLE: apresentado adequadamente.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo.

**ANEXO C – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação)**

Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

CRONOGRAMA: Adequado.

OBJETIVO ACADÊMICO: Não envolve obtenção de título.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 29/11/2008 e 29/11/2009.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

CEP 1735/07

Matos BM. Evaluation of the caries risk and fungal microbiota of pediatric patients with sickle cell anemia [dissertation]. São José dos Campos: São José dos Campos Dental School, UNESP – São Paulo State University; 2009.

## **ABSTRACT**

Children with sickle cell anemia are under long term prophylactic antibiotic treatment with penicillin. Little is known about the effects of this therapy on oral microbiota. The aim of the study was to evaluate the cariogenic microbiota, salivary flow rate and buffering capacity of pediatric patients with sickle cell anemia, to delineate a profile of caries risk. Also, the study aimed to evaluate the fungal microbiota in these patients in relation to control individuals. Sample of stimulated saliva from 25 children (aged 4 – 11) with sickle cell anemia (genotype SS) and both genders was collected. A matched control group was included. Intra-oral examination to determine dmft/DMFT index; salivary flow rate and buffering capacity evaluation were performed. Aliquots of saliva and its dilutions were plated onto selective media to mutans streptococci, lactobacilli and yeasts. After the incubation (37°C, 48h, 5% CO<sub>2</sub> to mutans streptococci), the value of cfu/ml of saliva was calculated. Strains of yeasts were isolated, and identified by API 20C AUX and *C. dubliniensis* by PCR. Data obtained by a questionnaire, salivary and microbiological data were analyzed by Cariogram program. The results were compared by Student's t test, Z test and Mann-Whitney. No significant difference were observed for the salivary flow ( $p = 0.097$ ) and salivary buffering capacity ( $p = 0.103$ ) of the studied groups. Counts of yeasts were significantly higher in the study group ( $p = 0.017$ ). Counts of mutans streptococci and lactobacilli were not different between test and control groups ( $p = 0.741$  e  $p = 0.423$ , respectively). Considering these results and the other parameters studied, it could be concluded that the caries risk between the groups was not different ( $p = 0.762$ ). In the study groups the following *Candida* species were identified: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. rugosa*, *C. sphaerica* and *C. tropicalis*. In the control group were found: *C. albicans*, *C. famata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *S. cerevisiae*. It could be conclude that most of patients showed high and very high caries risk in both groups studied, moreover the salivary levels of yeasts were higher in sickle cell anemia group.

**Keywords:** Sickle cell anemia. Dental caries. Saliva. Dental caries activity tests. *Streptococcus mutans*. *Lactobacillus*. Yeasts.