

*Leciana Paula De Angelis Messias*

*Ocorrência de Microrganismos  
Periodontopatogênicos e Víruses Herpéticos na  
Cavidade Bucal de Pacientes Portadores de  
Síndrome de Down.*

*Araçatuba-SP*

2009

*Leciana Paula De Angelis Messias*

*Ocorrência de Microrganismos  
Periodontopatogênicos e Víruses Herpéticos na  
Cavidade Bucal de Pacientes Portadores de  
Síndrome de Down.*

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação de Odontopediatria  
Da Faculdade de Odontologia -  
UNESP, Campus de Araçatuba,  
Como requisito para obtenção do  
Título de Mestre em Odontopediatria.

**Linha de pesquisa:** Prevenção da cárie

**Orientador:** Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Junior

**Co- Orientadora:** Prof: Dr<sup>a</sup> Sandra Maria H. C. Ávila Aguiar

*Araçatuba-SP*

2009

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M585e

Messias, Leciana Paula De Angelis

Ocorrência de microrganismos periodontopatogênicos e vírus herpéticos na cavidade bucal de pacientes portadores de Síndrome de Down / Leciana Paula De Angelis Messias. - Araçatuba : [s.n.], 2009

88 f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2009

Orientador: Prof. Elerson Gaetti Jardim Júnior

Coorientadora: Profa. Sandra Maria Herondina Coelho Ávila Aguiar

1. Gengivite 2. Bactérias 3. Vírus 4. Prevenção de doenças  
5. Síndrome de Down

Black D27

CDD 617.645

## *DEDICATÓRIA*

*Dedico este trabalho, a minha filha Letícia, que com sua inocência e brilho ilumina todos os dias da minha vida, me dando força, inspiração e aprendizado, para trilhar este novo caminho. Eu amo você minha princesa!!!*



## ***AGRADECIMENTOS ESPECIAIS***

*A Deus, pelas bênçãos infinitas que tornaram possíveis a realização de um sonho, e a certeza de sua Existência e de seu Amor.*

*Agradeço a minha mãe Silveriana por ter me dado a vida, amor, educação, e por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis.*

*Ao meu marido Alstair, pelo incentivo, paciência e compreensão para a realização desse projeto de vida.*

*Ao Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Junior, meu orientador, agradeço pelo carinho e paciência nas incansáveis orientações. Você foi além de mestre, um amigo, irmão, onde com sua sabedoria e capacidade, me ensinou muitas coisas que contribuíram para minha formação de mestre hoje. Dizer obrigada a você é muito pouco. Se a gratidão é a memória do coração, saiba que o registro da minha consideração é eterno.*

---

*A minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Maria Herondina C. Ávila Aguiar, agradeço por abrir as portas do Centro de Atendimento Odontológico á Excepcionais CAOÉ-centrinho, Araçatuba, onde foi possível dar os primeiros passos deste trabalho.*

---

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço as crianças com Síndrome de Down e suas famílias participantes da pesquisa, por me ensinar o quanto é especial ser especial.*

*A Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, nas pessoas do seu Diretor Prof. Dr. **Pedro Felício Estrada Bernabé** e vice-diretora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Ana Maria Pires Soubhía**, pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação.*

*Ao coordenador do curso de Mestrado em Odontopediatria o Professor Adjunto **Robson Frederico Cunha**, agradeço pelo profissionalismo e dedicação com que conduz os alunos, ajudando na minha formação clínica, científica e didática.*

*Aos demais professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Prof. Dr. **Alberto Carlos Botazzo Delbem**, ao Prof. Dr. **Célio Percinoto**, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Rosangela Santos Nery**, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> **Cleide Cristina Rodrigues Martinhon**, obrigada pela amizade e incentivo.*

---

*A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, agradeço pela transmissão de conhecimentos e ensinamentos durante os cursos de especialização e pós-graduação.*

*Agradeço a minha auxiliar **Fátima e Neusa**, por me ajudar na coleta do grupo controle, eu aprendi muito nesses treze anos de trabalho juntas. Obrigada pela torcida.*

*As minhas amigas **Karina Mirela, Alessandra**, e ao meu amigo **Máx**, obrigada por me auxiliar na coleta da APAE-Araçatuba, e por estar sempre ao meu lado como verdadeiros amigos, afastando de mim muitos momentos de solidão e saudades. Vocês são especiais!!!!*

*As alunas da graduação **Marcelle e Fernanda**, muito obrigado pelo apoio e ajuda fundamental em vários momentos dentro do laboratório.*

*Aos colegas da minha turma de Mestrado, em Odontopediatria, **Alessandra, Daniela, Isabelle, Lílian, Marcelo, Simone, Tatyana**, pela amizade, apoio, nesta caminhada comum. Muitos Sucessos!!!*

---

*Aos colegas de doutorado e os novos de mestrado, agradeço pelo bom convívio durante o curso.*

*Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Mário Luis da Silva, Maria dos Santos Ferreira Fernandes**, pela amizade e dedicação.*

*Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, pela eficiência, paciência e atenção.*

*Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Diogo Luis Reatto, Marina Midori Sakamoto Hawagoe e Valéria de Queiroz Zagatto**, pela eficiência, atenção, paciência a mim dedicado.*

*A todos os funcionários do Centro de Assistência Odontológica a Portadores de Necessidades Especiais-CAOE-UNESP, pela atenção, carinho e dedicação.*

*A APAE de São José do Rio Preto, a APAE de Araçatuba, a Associação Renascer de São José do Rio Preto, pela confiança e apoio.*

---

*A todos os professores, funcionários e estagiários do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, meus sinceros agradecimentos!!!!*

*Agradeço carinhosamente a Prof<sup>a</sup>. Dra. **Denise Pedrini Ostini** e a Prof<sup>a</sup> Dra. **Kikue Takebayashi Sasaki** pelas considerações e incentivo.*

*Agradeço à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> **Christiane Marie Schweitzer**, da Universidade Federal do ABC, Santo André, pelo desenvolvimento do programa de busca parametrizada utilizado no presente estudo e por todo auxílio na análise estatística dos dados, mesmo tendo de conciliar as obrigações de jovem mãe.*

*Aos meus **famíliares**, agradeço a força, torcida e confiança.*

*Aos alunos das escolas do Município de Planalto, junto com seus familiares por ajudarem na conclusão desta pesquisa.*

*A **Carla** e a **Marilene** pela ajuda na coleta de São José do Rio Preto, valeu meninas!!!!*

*Aos meus colegas de trabalho **Cristina** e **Renato**, pelo apoio e torcida.*

---

*O saber a gente aprende com os mestres e os livros.  
A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes.*

*Cora Coralina*

*Àqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste  
trabalho, meu muito obrigado...*

## Epígrafe

*Quando a solidão nos pega desprevenidos e, chegando sem mais avisos, se instala, começando a abrir e remexer baús antigos, descobrindo fantasmas esquecidos e espanando a poeira das amarguras, transportamo-nos para fora de nosso corpo e, entre devaneios e dúvidas, refletimos sobre a vida.*

*Ah! A vida! Quantas vezes nossas queixas beiram o insuportável, quantos problemas nos parecem insolúveis e as esperanças (ah! As esperanças!) como se assemelham a pálidas chamas de velas em final de pavio...*

*Nestes instantes, questionamo-nos sobre os tantos porquês de nossa existência, sobre tantos porquês...*

*Mas quando a incômoda visitante vai-se embora, recompomo-nos das desilusões e mágoas e um sorriso de paz volta a abrir nossos lábios cerrados.*

*Retomamos o cotidiano largado e, num suspiro de alívio, voltamos a viver, com a certeza de que vale a pena estar vivo!*

“A Vida”

(Autor desconhecido)

---

## Resumo

MESSIAS, L.P.A. **Ocorrência de Microrganismos Periodontopatogênicos e Vírus Herpéticos na Cavidade Bucal de Pacientes Portadores de Síndrome de Down.** 88 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência dos principais microrganismos periodontopatogênicos e dois vírus herpéticos na saliva e no biofilme microbiano supra e subgingival de 50 crianças e adolescentes com Síndrome de Down, através de métodos moleculares, comparando com um grupo de indivíduos de um grupo controle que não apresentam a síndrome. Espécimes clínicos foram coletados desses pacientes após avaliação das condições sócio-econômicas e comportamentais. A microbiota bucal dos pacientes foi caracterizada através da obtenção de amostras do biofilme subgingival, supragingival e saliva, as quais foram transportadas para o laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOA-UNESP para detecção dos principais patógenos por PCR. As características de saúde periodontal foram avaliadas segundo índices específicos. A possibilidade de inter-relações entre os diferentes microrganismos foi determinada através dos testes de Qui-quadrado, teste exato de Fisher e Mann-Whitney. Verificou-se que as condições de saúde periodontal das crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down não diferia significativamente do grupo controle. A ocorrência das espécies microbianas anaeróbias e microaerófilas mais associadas ao ambiente periodontal foi semelhante nos dois grupos de crianças e adolescentes, independentemente da condição gengival, com modesto aumento na ocorrência de *Prevotella intermedia* e *Enterobacteriaceae* na saliva dos pacientes síndrômicos, o mesmo ocorrendo com *Enterobacteriaceae*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella nigrescens* e gênero *Pseudomonas* no biofilme supragingival e *P. intermedia* no biofilme subgingival de pacientes síndrômicos saudáveis e pseudomonados naqueles com gengivite. A microbiota

---

associada às diferentes condições periodontais nos dois grupos também evidenciou pequenas diferenças, mas confirma o papel dos anaeróbios obrigatórios nesse processo e citomegalovírus e vírus Epstein-Barr, enquanto que nos pacientes sindrômicos, além desses microrganismos, as bactérias entéricas podem ser de relevância na gengivite e periodontite.

**Palavras-Chaves:** Gengivite. Bactéria. Vírus. Prevenção. Síndrome de Down.

---

## *Abstract*

Messias, L.P.A. **Occurrence of Microorganisms and Viruses herpetic periodontal pathogens in the oral cavity of patients with Down's syndrome.** 88 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba,2009.

This study aimed to evaluate the occurrence of the major periodontal pathogens and two herpetic viruses in saliva and dental biofilm from 50 children and adolescents with Down's syndrome through molecular tools, comparing with those of individuals of a control group who did not present this syndrome. Clinical samples were collected from patients soon after evaluation of socioeconomic and behavioral conditions. The oral microflora was characterized by mean of samples of supragingival and subgingival biofilm and saliva, which were transferred to Microbiology and Immunology Laboratory at FOA-UNESP for detection of the major pathogens by PCR. Periodontal conditions were evaluated through specific indexes. The possibility of relationship between different microorganisms and clinical conditions were determined through Chi-Square test, Fisher's exact test and Mann-Whitney test. It was verified that periodontal conditions of children and adolescents with Down's syndrome did not differ significantly from the control group conditions. The occurrence of anaerobes and microaerophiles associated with periodontal environment was similar in both groups of children and adolescents, regardless of the gingival condition, with modest increase in the occurrence of *Prevotella intermedia* and *Enterobacteriaceae* in the saliva of patients syndromic patients, the same occurred with *Enterobacteriaceae*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella nigrescens* and genus *Pseudomonas* in the supragingival biofilm and *P. intermedia* in subgingival biofilm of periodontally healthy patients and pseudomonads in syndromic patients with gingivitis. The microbiota associated with different periodontal conditions in both groups showed minor differences, but confirms the role of strict anaerobes in this process as well as the role of and cytomegalovirus and Epstein-Barr virus, while in syndromic

---

patients, besides these infectious agents enteric bacteria may be of relevant in gingivitis and periodontitis.

**Key-words:** Gingivitis. Bacteria. Virus. Prevention. Down's syndrome

---

## *Lista de figuras*

### Anexo 4

Figura 1	Pipetas Pasteur usada para coleta da saliva.....	87
Figura 2	Microtubos com Água de MiliQ para transferência dos espécimes clínicos.....	87
Figura 3	Coleta de biofilme supragengival com curetas em incisivo inferior.....	87
Figura 4	Coleta de biofilme supragengival com curetas em incisivo superior.....	87
Figura 5	Coleta de biofilme subgengival com cones de papel absorvente.....	87

### Anexo 5

Figura 6	Distribuição da amostra para amplificação do DNA.....	88
Figura 7	Aparelho de PCR Perkin Elmer, Gene Amp PCR System 2400.....	88
Figura 8	Cuba de eletroforese para separação dos amplicons.....	88
Figura 9	Transluminador Ultravioleta.....	88
Figura 10	Imagem da cadeia de DNA fotografada do transluminador ultravioleta.....	88

---

## *Lista de tabelas*

Tabela 1	Iniciadores específicos nos ensaios de PCR convencional para detecção de diferentes microrganismos por PCR convencional..	31
Tabela 2	Iniciadores e temperatura de anelamento empregados no “nested” PCR para detecção dos vírus EBV-1 e CMV.....	32
Tabela 3	Variações de normalidade ou enfermidade em 100 crianças e adolescentes portadores ou não de Síndrome de Down. Resultados obtidos através de exame clínico e avaliação de histórico médico e anamnese.....	36
Tabela 4	Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos estudados e vírus CMV e EBV-1 na saliva de crianças e adolescentes com Síndrome de Down e do grupo controle.....	41
Tabela 5	Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos estudados e vírus CMV e EBV-1 no biofilme supragengival de crianças e adolescentes com Síndrome de Down e grupo controle.....	42
Tabela 6	Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos estudados e vírus CMV e EBV-1 no biofilme subgengival de crianças e adolescentes com Síndrome de Down e grupo controle.....	43

---

## *Lista de Abreviatura*

AAP=	American Association of Periodontology
ADA=	American Dental Association
APAE=	Associação de pais e Amigos dos Excepcionais
CAOE=	Centro de Assistência Odontológica a Portadores de Necessidades Especiais
CEO-D=	Cariados, extraídos, obturados em dentes decíduos
CMV=	Citomegalovírus
CPO-D=	Cariados, perdidos, obturados em dentes permanentes
EBV-1=	Vírus Epstein-Barr tipo 1
PCR=	Reação em cadeia da polimerase
PSR=	Periodontal Screening and Recording
UNESP=	Universidade Estadual Paulista
UV=	Ultravioleta

---

## *Sumário*

Introdução.....	20
Proposição.....	24
Material e Método.....	25
Resultados.....	34
Discussão.....	44
Conclusão.....	59
Referências.....	60
Anexos.....	72

---

---

## 1 Introdução

A Síndrome de Down é considerada a mais freqüente das síndromes com marcada influência da hereditariedade, cuja ocorrência é encontrada em 1:800 nascimentos, mostrando-se mais comum entre filhos de parturientes com 40 anos de idade ou mais,<sup>1</sup> podendo ser definida como uma desordem genética caracterizada pela presença de um cromossomo 21 adicional, acarretando variável grau de retardo no desenvolvimento motor, físico e mental, sendo geralmente reconhecida por uma constelação de anormalidades associadas.<sup>2,3</sup>

As principais manifestações bucais faciais dessa síndrome são macroglossia, língua fissurada, alterações no desenvolvimento maxilo-mandibular, agenesia dental, má-oclusão, hipersalivação, baixa prevalência de cárie, maior predisposição à doença periodontal agressiva e patologias infecciosas,<sup>4,5,6,7,8,9,10</sup> cálculo supragengival e ocorrência de microdontia.<sup>11</sup> A literatura também evidencia um menor risco à cárie e maior risco ao desenvolvimento de periodontopatias, mas os mecanismos pelos quais esse fenômeno se daria ainda não estão elucidados, mas destaca-se a maior produção de saliva no paciente portador da síndrome, sendo que por outro lado, a resposta imune celular no periodonto por vezes se mostra prejudicada, com redução da quimiotaxia de células acessórias e presença de muitos linfócitos T imaturos.<sup>6,8,10,12,13</sup>

Como a maioria dos processos patológicos que acomete a cavidade bucal é de natureza infecciosa, com o envolvimento predominante de microrganismos anaeróbios obrigatórios, a composição da microbiota bucal e a forma com que a mesma se relaciona com seu hospedeiro são de fundamental importância para o estabelecimento desses processos infecciosos.<sup>14, 15,16</sup>

Nesse sentido, estudos com adolescentes e crianças portadoras de síndrome de Down evidenciaram relação entre a colonização da cavidade bucal desses pacientes por *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*,

*Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* entre outros, e o desenvolvimento de perdas significativas de inserção conjuntiva e inflamação gengival,<sup>4,17,18</sup> além de possíveis associações com citomegalovírus e vírus Epstein-Barr nos casos mais avançados ou agudos de periodontite.<sup>19</sup>

Contudo, a existência de uma microbiota associada a periodontite ou gengivite em pacientes portadores da Síndrome de Down vem sendo bastante questionada, sendo que alguns autores não detectaram diferenças qualitativas ou quantitativas na microbiota desses pacientes e outros indivíduos com necessidades especiais, como os portadores de paralisia cerebral.<sup>20</sup> Além desse aspecto, as populações de diferentes áreas geográficas apresentam peculiaridades na composição de sua microbiota bucal, refletindo características genéticas, ambientais, culturais e sócio-econômicas, de forma que a extrapolação do perfil de colonização da cavidade bucal entre diferentes populações constitui procedimento inadequado.<sup>15,21,22</sup>

Em anos recentes, a compreensão do papel desempenhado pelas bactérias nas doenças periodontais foi sendo aprimorada e a literatura passou a sugerir que a reativação de infecções herpéticas, quase sempre subclínicas, nos tecidos periodontais, poderia criar condições favoráveis à agressão bacteriana ao hospedeiro. Nesse sentido, citomegalovírus (CMV) e o vírus Epstein-Barr tipo 1 (EBV-1) podem estar associados a modificações na resposta imunológica e inflamatória nas doenças periodontais, sendo capazes de induzir imunossupressão local e exacerbação das patologias infecciosas periodontais, bem como lesões periapicais,<sup>23,24,25,26</sup> além de afetar a capacidade de expressão de citocinas e outras interleucinas, o que afetaria a resposta inflamatória tecidual.<sup>27</sup> Entretanto, pouco se conhece sobre o quanto essas habilidades virais poderiam interferir nas condições de saúde gengival de crianças e adolescentes que, em função de uma característica genética, são mais predispostos

ao desenvolvimento de enfermidades infecciosas, como as periodontites agressivas e infecções respiratórias.<sup>10</sup>

A microbiota bucal, entretanto, sofre influência de numerosos fatores, como higiene, condição imunológica e uso de antimicrobianos, sendo que em alguns pacientes, notadamente aqueles que mostram comprometimento imunológico, a cavidade bucal pode ser colonizada por microrganismos exógenos, os quais podem exercer sua virulência de forma a induzir alterações inflamatórias ou necróticas nos tecidos periodontais.<sup>28,29,30,31,32</sup>

Dentre esses patógenos, merecem destaque os microrganismos entéricos e os pseudomonados,<sup>33,34</sup> que também se comportam como superinfectantes,<sup>35</sup> de forma que a cavidade bucal pode se tornar reservatório desses microrganismos oportunistas e seus genes de resistência, os quais podem ser transmitidos para outros microrganismos no biofilme,<sup>33</sup> além de constituir fonte de infecção.<sup>36</sup>

Em teoria, as limitações dos pacientes portadores de síndrome de Down, bem como as particularidades imunológicas, anatômicas e fisiológicas poderiam alterar a ocorrência e distribuição dos principais microrganismos envolvidos em processos infecciosos como os anaeróbios e microaerófilos bucais, bem como microrganismos superinfectantes, como a família *Enterobacteriaceae*, gêneros *Enterococcus* e *Pseudomonas*, bem como *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, predispondo o paciente a uma colonização mais precoce ou mesmo interferindo com as populações desses microrganismos no interior do biofilme microbiano, o que poderia contribuir para o estabelecimento de processos inflamatórios de natureza infecciosa, como as doenças periodontais.<sup>37</sup>

Nesse aspecto, a microbiota bucal de pacientes com Síndrome de Down, em nosso meio, necessita de melhor caracterização, particularmente quando se verifica que os pacientes portadores de Síndrome de Down atendidos em programa especializados, como o Centro de Assistência Odontológica a Portadores de Necessidades Especiais (CAOE), vinculado à

Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba-UNESP, mostram uma frequência de alterações inflamatórias gengivais nitidamente inferior à descrita na literatura e esse fenômeno necessita de maiores esclarecimentos, uma vez que a política de atendimento dessa população poderia ser aprimorada.

Essa escassez de dados é ainda mais significativa quando são considerados os aspectos epidemiológicos e predisponentes das doenças periodontais em populações com necessidades especiais na América Latina, sendo que essa região do globo apresenta características muito peculiares, como a profunda miscigenação étnico-racial, extrema desigualdade sócio-econômica, fortes laços familiares, mudança recente da estrutura social e pirâmide etária, a qual passa a incorporar a figura da mãe que trabalha fora de seu domicílio e passa a contribuir de forma determinante com a renda familiar. A própria figura materna e o seu papel na criação dos filhos sofreram profundas mudanças, nas últimas décadas na América Latina, com profunda redução no tamanho das famílias, com poucos filhos por casal e, por fim, modificação dos hábitos alimentares.

Além das doenças periodontais, sabe-se que as bactérias anaeróbias e microaerófilas bucais estão envolvidas em diversos outros processos infecciosos e poucos são os laboratórios clínicos ou de pesquisa, no Brasil, que realizam o isolamento, identificação e detecção desses microrganismos, seja por métodos convencionais quanto moleculares.<sup>38</sup> Contudo, os métodos de diagnóstico molecular, como os baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), se converteram em uma importante ferramenta na identificação das espécies microbianas bucais, principalmente para microrganismos de cultivo exigente,<sup>39,40,41</sup> além de colaborar na compreensão das inter-relações entre essa microbiota e seu hospedeiro.<sup>42</sup>

## 2 Proposição

Assim, em função do papel desempenhado pela microbiota e diferentes fatores predisponentes no estabelecimento e progressão das doenças periodontais, particularmente em crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down, este estudo tem como proposta:

- a) avaliar, por PCR convencional ou “*nested*” PCR, a ocorrência dos principais periodontopatógenos e víruses herpéticos associados às doenças periodontais, no biofilme subgengival, biofilme supragengival, bem como a contaminação microbiana presente na saliva de crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down, comparando esses dados com os obtidos para um grupo controle constituído de indivíduos não portadores de Síndrome de Down;
  - b) correlacionar a presença dos diferentes microrganismos e víruses com as condições clínicas periodontais desses pacientes, portadores de Síndrome de Down ou não;
  - c) verificar a ocorrência de microrganismos superinfectantes na cavidade bucal de crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down, comparando esses dados com os obtidos para um grupo controle.
-

### **3 Material e Método**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UNESP-Câmpus/Araçatuba (2007-01369), sob o título “Condições de Saúde Bucal em Pacientes com Síndrome de Down: Avaliação dos Fatores Sócio-Econômicos, Culturais, Dietéticos e Microbiológicos” (Anexo 2). Os objetivos do presente estudo foram detalhados para todos os participantes e seus responsáveis e somente participaram do mesmo aqueles cujos responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 3).

#### **3.1 População estudada**

A amostra estudada foi constituída de 50 crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down, com diagnóstico devidamente comprovado através do exame de cariótipo, de ambos os gêneros (31 do gênero masculino e 19 do gênero feminino), com idade variando de 6 a 18 anos (11,45 anos de média e desvio padrão de 3,93 anos), bem como um grupo de 50 indivíduos não portadores dessa síndrome e que apresentavam a mesma faixa etária (11,60 anos de média e desvio padrão de 3,87 anos) e distribuição por gênero (28 do gênero masculino e 22 do gênero feminino), constituindo um grupo controle.

Os pacientes portadores de Síndrome de Down foram selecionados no Centro de Assistência Odontológica a Portadores de Necessidades Especiais (CAOE), UNESP-Araçatuba, bem como na Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais- APAE de São José do Rio Preto e na Associação Renascer-Centro de Reabilitação e Integração de São José do Rio Preto, onde recebiam assistência odontológica. Assim, preferiu-se selecionar crianças de mais de uma instituição para garantir que os dados viessem a refletir as condições de uma população mais ampla.<sup>43</sup>

---

As crianças e adolescentes do grupo controle foram selecionadas na Escola Municipal “Geraldo Alves Moreira” e da Escola Estadual “João Baptista Teixeira”, no município de Planalto, Estado de São Paulo, onde as crianças e adolescentes do grupo controle eram assistidas pelo programa odontológico municipal.

Inicialmente foram excluídos do grupo de pacientes portadores de Síndrome de Down e grupo controle todos os pacientes que utilizavam quimioterápicos,<sup>44</sup> receberam medicação tópica (bucal) ou sistêmica com atividade antimicrobiana nos quatro meses que precederam as coletas para análise da microbiota, que fizeram uso de medicamentos capazes de afetar o fluxo salivar ou que possuíam doenças debilitantes sistêmicas adicionais ou que interferissem significativamente com a biologia bucal.<sup>45,46</sup> Da mesma forma, pacientes grávidas, lactantes, indivíduos que receberam tratamento periodontal nos seis meses que precederam a coleta dos espécimes clínicos ou que possuíam enfermidades sistêmicas não participaram do estudo.<sup>21</sup>

Os participantes do grupo controle foram selecionados através de um sistema de busca parametrizada especialmente desenvolvido para esse fim pela Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Christiane Marie Schweitzer do Centro de Matemática Computação e Cognição da Universidade Federal do ABC, respeitando-se os critérios descritos acima.

### **3.2 Exame Clínico Periodontal**

Inicialmente precedeu-se a anamnese, em formulários padronizados, constando a identificação do paciente, idade, aspectos étnico-raciais, história da doença atual, histórias social, médica e familiar. A seguir realizaram-se os exames clínicos intra e extrabucais.

Os exames clínicos periodontais foram realizados por um único examinador previamente treinado, utilizando-se os critérios do *Periodontal Screening and Recording* (PSR). O exame foi realizado com o uso de espelho bucal plano, pinça para algodão (Duflex<sup>R</sup>), sondas periodontais milimetradas tipo Williams (Trinity<sup>R</sup>). A sonda era introduzida

---

no sulco gengival, de maneira delicada, posicionada paralela ao longo eixo do dente e esta percorria todas as faces dos dentes presentes de cada indivíduo. A cavidade bucal do indivíduo era dividida em seis sextantes.

O maior escore do PSR era registrado para cada um dos sextantes e que se ausente, era registrado com um X. Os escores variaram de 0 a 2, embora essa categorização abranja os escores de 0 a 4. Código 0: ausência de bolsa periodontal, sem sangramento a sondagem, ausência de cálculo e excessos de margens restauradoras. Código 1: ausência de bolsa periodontal, embora com presença de sangramento a sondagem; sem cálculo e excessos nas margens das restaurações. Código 2: ausência da bolsa periodontal, sangramento a sondagem, presença de cálculo supra e/ou subgengival e/ou excessos nas margens de restaurações. Os códigos 3 e 4 descrevem condições de periodontite e não foram observados na população estudada.

A inserção do código (\*) no sextante significava a presença de problemas como mobilidade, problemas muco-gengivais (perda de gengiva inserida) e retração gengival acima de 3,5mm. Os dados coletados eram registrados em ficha apropriada, segundo recomendação da American Dental Association (ADA) e American Association of Periodontology (AAP). A seguir avaliava-se o índice de sangramento gengival,<sup>47</sup> presença de cálculo supragengival, determinação da profundidade clínica de sondagem, bem como a ausência ou presença de placa visível.

No atendimento da população alvo, todas as lesões teciduais e/ou variações de normalidade clinicamente detectáveis eram avaliadas considerando sua natureza, localização, formato, superfície, consistência, cor, base de implantação, sintomatologia, presença ou ausência de úlcera, bem como necessidade de encaminhamento para tratamento ou acompanhamento.

---

### **3.3 Obtenção dos espécimes clínicos para avaliação da microbiota bucal**

Os pacientes de ambos os grupos foram divididos de acordo com os valores do PSR apresentados no exame periodontal. De forma resumida, para o grupo de pacientes portadores de Síndrome de Down, os mesmos foram agrupados em “pacientes sadios” (N=18) ou “portadores de gengivite” (N= 32), enquanto no grupo controle, 24 eram periodontalmente sadios e 26 eram portadores de gengivite.

As coletas de biofilme supragengival e saliva não estimulada foram realizadas imediatamente antes do exame clínico dos pacientes (Anexo 4). A saliva foi coletada das 8:00 hs às 11:00 hs para evitar grandes variações do ritmo circadiano, em pacientes que estavam em jejum e sem higienização dental por um período mínimo de 2 horas. A saliva era coletada através de pipetas Pasteur plásticas, esterilizadas, que aspiravam de 0,2 mL a 1 mL de saliva no assoalho de boca dos pacientes, a qual era transferida para microtubos contendo água ultrapura Milli Q, que eram mantidos em gelo durante o transporte para o laboratório e então armazenados a -196°C, por até 30 dias (até a extração do DNA bacteriano).

A amostra do biofilme supragengival de cada paciente era removida com auxílio de curetas esterilizadas e transferidas para microtubos contendo água ultrapura Milli Q, como descrito acima. O sítio da coleta era o equivalente supragengival do sítio periodontal com maiores evidências clínicas de inflamação e maior profundidade clínica de sondagem.

A coleta dos espécimes do biofilme subgengival foi realizada após a remoção do biofilme supragengival com curetas periodontais e o sítio coletado foi, como descrito acima, o que apresentava a associação de maior profundidade clínica de sondagem e presença de inflamação clinicamente detectável. A coleta era realizada por meio de cones de papel absorvente esterilizados, que eram introduzidos no interior dos sulcos gengivais, onde permaneciam por 15 a 20 segundos.<sup>48</sup> Todos os espécimes coletados eram transferidos imediatamente para microtubos contendo água ultrapura Milli-Q e submetidos ao

---

processamento laboratorial para extração do DNA microbiano. Quando não era possível a extração imediata do DNA, as amostras clínicas eram mantidas em nitrogênio líquido a -196°C, por até 30 dias.

### **3.4 Extração do DNA bacteriano e determinação de sua concentração**

O DNA das amostras clínicas nos microtubos com água Milli Q era extraído através do “kit” QIAamp DNA (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Cada amostra era adicionada a 20µL de proteinase K, seguida de 200µL do tampão AL, mantendo-se a mistura a 56°C, por 10 minutos, adicionando-se, a seguir, etanol absoluto (200 µL) e centrifugando-se o conjunto através do “QIAamp Column”, a 6000xg, por 1 minuto.

A seguir, desprezava-se o filtrado e eram adicionados 500 µL do tampão AW1 e repetia-se a centrifugação, desprezando-se, novamente, o filtrado. Imediatamente, 500 µL do tampão AW2 eram adicionados ao “QIAamp Column” e o conjunto era centrifugado a 20.000xg por 3 minutos. Desprezava-se o filtrado, enquanto 200 µL de tampão AE eram adicionados ao “QIAamp Column”, por 1 minuto, antes de submeter o conjunto à centrifugação final a 6000xg, por 1 minuto. O filtrado era mantido a -196°C. As concentrações dos DNA bacterianos eram determinadas em espectrofotômetro (Beckman, Modelo DU-640), com leitura da absorbância ( $A_{260\text{ nm}}$ ).

### **3.5 Detecção de microrganismos por PCR convencional**

A presença dos seguintes periodontopatógenos foi avaliada por PCR convencional: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Dialister pneumosintes*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*.<sup>49,50,51</sup> Empregaram-se iniciadores específicos e condições de amplificação específicas para cada microrganismo.

---

Além desses microrganismos, também optou-se por avaliar a ocorrência de patógenos considerados de importância médica e de notório envolvimento em infecções graves e de difícil tratamento: família *Enterobacteriaceae*, gênero *Enterococcus* sp., *E. faecalis*, gênero *Pseudomonas* sp. e *P. aeruginosa*.<sup>52,53,54,55</sup>

A presença de víruses da família *Herpesviridae* (citomegalovírus e vírus Epstein-Barr tipo 1) foi avaliada através de “*nested*” PCR.<sup>56</sup> As reações de “*nested*” PCR podem ser descritas como um processo de amplificação no qual o produto de um conjunto de ciclos de amplificação inicial, empregando-se iniciadores externos, é sucedida por uma segunda reação de ciclos de amplificação, na qual o produto da primeira reação (5µL) é amplificado com a ação da DNA polimerase e um par de iniciadores denominados “iniciadores internos”, garantindo grande sensibilidade e especificidade.

Os iniciadores utilizados na amplificação do DNA alvo são apresentados conjuntamente com a temperatura de anelamento dos mesmos nas **Tabela 1**, para as diferentes bactérias avaliadas, e **Tabela 2**, para os víruses herpéticos detectados por “*nested*” PCR.

---

**Tabela 1.** Iniciadores específicos utilizados nos ensaios de PCR convencional para detecção de diferentes microrganismos por PCR convencional.

Iniciadores específicos	Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	5'-CTA GGT ATT GCG AAA CAA TTT G-3' 5'-CCT GAA ATT AAG CTG GTA ATC-3'	60°C
<i>C. rectus</i>	5'- TTT CGG AGC GTA AAC TCC TTT TC-3' 5'- TTT CTG CAA GCA GAC ACT CTT-3'	55°C
<i>D. pneumosintes</i>	5'-TTC TAA GCA TCG CAT GGT GC-3' 5'-GAT TTC GCT TCT CTT TGT TG-3'	55°C
<i>E. corrodens</i>	5'- CTA ATA CCG CAT ACG TCC TAA G-3' 5'- CTA CTA AGC AAT CAA GTT GCC C-3'	45°C
<i>Enterobacteriaceae</i>	5'-AAC CAG TTC CGC GTT GGC CTG G-3' 5'-CCT GAA CAA CAC GCT CGG A-3'	50°C
<i>Enterococcus sp.</i>	5'- TAC TGA CAA ACC ATT CAT GAT G-3' 5'- AAC TTC GTC ACC AAC GCG AAC -3'	55°C
<i>E. faecalis</i>	5'- ATC AAG TAC AGT TAG TCT-3' 5'- ACG ATT CAA AGC TAA CTG-3'	47°C
<i>F. nucleatum</i>	5'-ATT GTG GCT AAA ATT ATA GTT-3' 5'-ACC CTC ACT TTG AGG ATT ATA G-3'	40°C
<i>P. gingivalis</i>	5'-TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA CC-3' 5'-ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC-3'	60°C
<i>P. intermedia</i>	5'-TTT GTT GGG AGT AAA GCG GG-3' 5'-TTC AAC ATC TCT GTA TCC TGC GT-3'	55°C
<i>P. nigrescens</i>	5'-ATG AAA CAA AGG TTT CCG GTA AG-3' 5'-CCA CGT CTC TGT GGC TGC GA-3'	55°C
<i>Pseudomonas sp.</i>	5'-GAC GGG TGA GTA ATG CCT A-3' 5'-CAC TGG TGT TCC TTC CTA TA-3'	54°C
<i>P. aeruginosa</i>	5'-GGG GGA TCT TCG GAC CTC A-3' 5'-TCC TTA GAG TGC CCA CCC G-3'	58°C
<i>T. forsythia</i>	5'-GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA-3' 5'-TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T-3'	60°C
<i>T. denticola</i>	5'-TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T- 3' 5'-CAA AGA AGC ATT CCC TCT TCT TCT TA-3'	55°C
Universal	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTG AG-3' 5'- ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'	55°C

**Tabela 2.** Iniciadores e temperatura de anelamento empregados no “nested” PCR para detecção dos vírus EBV-1 e CMV.

Iniciadores específicos	Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento
Citomegalovírus	5'-GAG GAC AAC GAA ATC CTG TTG GGC A-3' inic. externo	Inic. Externo 56°C Inic. Interno 50°C
	5'-TCG ACG GTG GAG ATA CTG CTG AGG-3' inic. externo	
	5'-ACC ACC GCA CTG AGG AAT GTC AG-3' inic. interno	
	5'-TCA ATC ATG CGT TTG AAG AGG TA-3' inic. interno	
Epstein-Barr tipo 1	5'-AGG GAT GCC TGG ACA CAA GA-3' inic. externo	Inic. Externo 56°C Inic. Interno 46°C
	5'-TGT GCT GGT GCT GCT GGT GG-3' inic. externo	
	5'-AAC TTC AAC CCA CAC CAT CA-3' inic. interno	
	5'-TTC TGG ACT ATC TGG ATC AT-3' inic. interno	

### 3.5.1 Reação de amplificação do DNA por PCR convencional e “nested” PCR

A amplificação do DNA foi realizada em volumes de 25 µl, contendo 2,5 µl de 10 X tampão PCR, 1,25 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2,0 µl de dNTP (10 mM), 0,25 µl de *Taq* DNA polimerase (0,5 U), 1,0 µl de cada iniciador (0,4 µM), 7 µl de água ultrapura Milli-Q esterilizada e 10 µl de DNA (ng). A amplificação foi realizada em aparelho de PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400) programado para: 1 ciclo de 94°C (5 min.); 30-36 ciclos de 94°C (30s- 1 min.), temperatura de anelamento de cada iniciador (30s -2 min.), 72°C (30s-1 min.) e um ciclo final de 72°C (5 min.), para a elongação final das cadeias de DNA dos amplicons ( Anexo 5).

Em todas as reações foram utilizadas, como controle positivo, DNA de cepas de referência das bactérias estudadas, enquanto DNA controle dos vírus EBV-1 e CMV foi fornecido pelo Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biomédicas -USP. Os produtos da amplificação pelo PCR eram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e fotografados sobre transiluminador com luz UV

com câmara Kodak (Electrophoresis Documentation and Analyses System 120). Como padrão de peso molecular utilizou-se o marcador 1Kb DNA ladder (Gibco, SP).

### **3.6 Análise Estatística**

As amostras permitiram, através de estatísticas pontuais e intervalos de confiança, caracterizar os dois grupos experimentais quanto aos parâmetros microbiológicos. Prevalência e análise de risco foram feitas utilizando-se o teste de Qui-quadrado de Pearson para análise de proporções quando as variáveis possuírem 3 ou mais categorias, ou o testes de Mann-Whitney. Os níveis de significância adotados nos testes foram sempre iguais a 5%. Os dados foram tabulados e analisados em planilhas do software SPSS. A análise estatística foi realizada no Centro de Matemática Computação e Cognição da Universidade Federal do ABC, sob responsabilidade da Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Christiane Marie Schweitzer.

## 4 Resultados

Os resultados apresentados evidenciam que a amostra de 50 indivíduos portadores de Síndrome de Down e 50 indivíduos não portadores de Síndrome de Down submetidos aos exames clínicos iniciais apresentou boa homogeneidade em termos de idade e gênero entre os dois grupos de pacientes (teste Qui-quadrado,  $P= 0,905$ ), sendo que não foram observadas diferenças de idade entre os gêneros (teste de Mann-Whitney,  $P=0,550$ ), garantindo os critérios de homocedasticidade e validaram o uso do sistema parametrizado de busca. Os dados evidenciaram que o gênero masculino mostrou-se mais propenso a ser portador da Síndrome de Down na amostra (teste de Qui-quadrado,  $P < 0,001$ ).

Do ponto de vista social, a quase totalidade dos adolescentes e crianças com Síndrome de Down e do grupo controle era oriunda de famílias cujos pais apresentavam baixo nível de instrução e possuíam profissões que se caracterizavam predominantemente pela existência de serviço braçal. Entre as crianças e os adolescentes, de ambos os grupos a dieta apresentou características de consumo de alimentos cariogênicos típicos (teste de Qui-quadrado,  $P < 0,001$ ), mesmo com a orientação dos pais e responsáveis e dos próprios pacientes.

Embora não tenha sido objetivo do estudo inicial, as condições dentárias dos pacientes com Síndrome de Down mostraram um índice ceo-d e CPO-D de 1,17 e 3,53, respectivamente, enquanto apenas um paciente se mostrou livre de cárie aos 6 anos. No grupo controle, o índice ceo-d foi 1,97, enquanto o índice CPO-D mostrou-se igual a 2,77, sendo que apenas um paciente se mostrou livre de cárie aos 6 anos. Nos pacientes com Síndrome de Down a somatória ceo-d + CPO-D resultou em um valor médio de 4,70, enquanto que no grupo controle foi de 4,74, sendo que essa diferença não apresenta significância estatística.

Na anamnese e avaliação do histórico médico, observou-se que 40% dos integrantes do grupo de portadores de Síndrome de Down eram portadores de hipersensibilidade a algum medicamento, alimento ou produto cosmético, o mesmo ocorrendo com 24% dos integrantes

---

do grupo teste, sendo que essa diferença foi estatisticamente significativa (teste de Qui-quadrado,  $P= 0,042$ ). A ocorrência de múltiplas e freqüentes infecções respiratórias, particularmente pneumonia, também somente foi detectada em crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down. Por outro lado, a única alteração de normalidade na cavidade bucal observada entre os pacientes com Síndrome de Down foi a ocorrência de macroglossia, a qual foi observada em 22% dos pacientes portadores de Síndrome de Down e não foi detectada entre os pacientes do grupo controle (teste de Qui-quadrado,  $P = 0,028$ ). Um único paciente não portador da síndrome apresentou anquiloglossia (**Tabela 3**).

Quanto aos métodos empregados na higiene bucal, os dois grupos apresentam comportamento semelhante, sendo que a escovação bucal com creme dental é praticada em todas as crianças portadoras de Síndrome de Down, o mesmo ocorrendo com 98% dos integrantes do grupo controle. Contudo, o emprego de fio dental era negligenciado em 26% dos integrantes de ambos os grupos.

---

**Tabela 3.** Variações de normalidade ou enfermidades em 100 crianças e adolescentes portadores ou não de Síndrome de Down. Resultados obtidos através de exame clínico e avaliação de histórico médico e anamnese.

Observações ao exame clínico	Grupos experimentais	
	CASD <sup>1</sup> N(%) <sup>2</sup>	CANS <sup>2</sup> N(%)
Gengivite	32 (64,0)	26 (52,0)
Macroglossia	11 (22,0)*	0 (0,0)
Estomatite aftosa	2 (4,0)	0 (0,0)
Anquiloglossia	0 (0,0)	1 (2,0)
<b>Histórico médico</b>		
Hipersensibilidade	20 (40,0)*	12 (24,0)
Infecções respiratórias frequentes	16 (32,0)* <sup>3</sup>	0 (0,0)
Cardiopatias Congênitas	7 (14,0)	1(2,0)
Talassemia	4 (8,0)	0 (0,0)
Anemia crônica	3 (6,0)	0 (0,0)

<sup>1</sup>Crianças e adolescentes com Síndrome de Down

<sup>2</sup>Crianças e adolescentes não portadores de Síndrome de Down

<sup>3</sup>Particularmente pneumonia.

\*Diferenças estatisticamente significativas (P<0,05)

As condições de saúde dos tecidos moles da cavidade bucal dos integrantes dos dois grupos de crianças e adolescentes que participaram do estudo evidenciaram ausência de lesões clinicamente detectáveis, excetuando-se a inflamação do tecido gengival, a qual se mostrou bastante freqüente nos dois grupos. Nesse sentido, no grupo de crianças e adolescentes com Síndrome de Down, 18 (36,0%) eram periodontalmente saudáveis e 32 (64,0%) apresentavam gengivite, sendo que um adolescente se mostrou portador de gengivite severa. No grupo controle, 24 (48,0%) eram clinicamente saudáveis e 26 (52,0%) albergavam gengivite leve a moderada, segundo os critérios do PSR. Essa diferença de prevalência de gengivite não mostrou significância estatística.

Essas alterações gengivais e os demais problemas bucais associados aos tecidos mole não foram influenciadas pela idade (teste de Mann-Whitney,  $P= 0,193$ ), gênero (teste de Qui-quadrado,  $P= 0,711$ ), higiene bucal (teste de Qui-quadrado,  $P = 0,142$ ) ou dieta (teste de Qui-quadrado,  $P= 0,181$ ).

Não foram observadas relações entre sangramento gengival e gênero dos pacientes. A freqüência de escovação na população estudada não se mostrou influenciada pelo gênero, idade, mas como a freqüência de escovação e uso do fio dental era declaratória, essa informação pode ter sido influenciada por aspectos culturais, visto que as condições de higiene bucal da população não foram compatíveis com o que era esperado em função do declarado. Assim, os dados que mostram que pelo índice de sangramento não foram influenciados pela freqüência de escovação ou pelo uso de fio dental devem ser entendidos dentro da polêmica descrita acima ou pela baixa eficiência da higiene oral praticada pela população estudada.

Quanto aos dados microbiológicos, verifica-se que cada espécie microbiana interage de diferentes formas com os fatores ambientais e com os demais membros da microbiota. A **Tabela 4** apresenta a freqüência de detecção dos microrganismos e vírus estudados nas

---

amostras de saliva da população alvo, enquanto as **Tabela 5** traz os dados relativos ao biofilme supragengival e as **Tabela 6** apresenta os resultados referentes aos microrganismos e vírus nas amostras de biofilme subgengival, respectivamente.

Para a maioria dos microrganismos estudados, o habitat principal na cavidade bucal da população se deu no sulco gengival ou no biofilme supragengival. O biofilme subgengival parece ser a fonte de contaminação para *D. pneumosintes*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, além dos vírus CMV e EBV-1, enquanto o biofilme supragengival parece ser a fonte de contaminação da saliva pelo gênero *Enterococcus* e *E. faecalis*. Para outros, como *C. rectus*, *E. corrodens*, família *Enterobacteriaceae*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Pseudomonas* sp. e *P. aeruginosa*, os biofilmes supra e subgengivais parecem ter a mesma importância como fonte de contaminação para a saliva. A fonte de *T. denticola* não pode ser estatisticamente determinada em função da baixa frequência de detecção do mesmo e a sua homogênea distribuição nos biofilmes coletados e na saliva.

A análise da frequência de detecção dos diferentes microrganismos estudados sugere associações positivistas entre os membros do biofilme subgengival. Nesse sentido, *E. corrodens* parece ter associações sinérgicas com *C. rectus*, *T. forsythia*, *P. nigrescens*, enquanto *C. rectus* estabelece associações sinérgicas com *T. forsythia*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *P. nigrescens*. As associações entre as diferentes espécies de bastonetes anaeróbios produtores de pigmento preto também foram detectadas, merecendo destaque *P. intermedia* e *P. nigrescens*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*, bem como *P. gingivalis* e *P. nigrescens*. As interações entre *T. forsythia* se deram de forma mais intensa com *E. faecalis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *P. gingivalis*.

A distribuição de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* sp. e *P. aeruginosa* não se mostrou ligada a quaisquer dos microrganismos estudados, enquanto a ocorrência de Epstein-

---

Barr tipo 1 e CMV mostraram relação com a ocorrência de *C. rectus*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. forsythia*. A ocorrência de *E. corrodens*, *C. rectus*, *F. nucleatum* e *P. gingivalis* foi significativamente maior entre os indivíduos com maior índice de placa, enquanto *F. nucleatum*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* foram associados a sangramento gengival.

Quando os dados das **Tabelas 4, 5 e 6** são analisados (teste de Qui-quadrado), verifica-se que, independentemente da condição periodontal das crianças e adolescentes dos dois grupos, a ocorrência das espécies microbianas anaeróbias e microaerófilas mais freqüentemente associadas ao ambiente periodontal, sobre a qual normalmente recai o desenvolvimento das infecções periodontais, é bastante semelhante nos dois grupos de crianças e adolescentes, com diferenças modestas de prevalência entre ambos.

Das espécies periodontopatogênicas, apenas *P. intermedia* foi observado com maior freqüência na saliva dos indivíduos portadores de Síndrome de Down (**Tabela 4**). Entretanto, a ocorrência de membros da família *Enterobacteriaceae* foi muito maior em todos os espécimes clínicos obtidos de indivíduos portadores de Síndrome de Down. Embora sem atingir significância estatística, as amostras de saliva de crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down mostram maior probabilidade de possuírem bactérias do gênero *Pseudomonas* (teste de Qui-quadrado,  $P=0,058$ ).

Quanto ao biofilme supragengival (**Tabela 5**), as amostras de pacientes portadores de Síndrome de Down apresentaram maior ocorrência de *Enterobacteriaceae*, *C. rectus*, *P. nigrescens* e gênero *Pseudomonas*. Quanto aos dados referentes ao biofilme subgengival, observou-se que uma maior ocorrência de *P. intermedia* em indivíduos portadores de Síndrome de Down periodontalmente saudáveis, quando comparados com os indivíduos do grupo controle com essa mesma condição periodontal, enquanto apenas o gênero *Pseudomonas* se

---

mostrou mais prevalente em crianças portadoras de Síndrome de Down com gengivite em relação ao grupo controle com essa mesma condição periodontal (**Tabela 6**).

Nas crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down, a ocorrência da família *Enterobacteriaceae*, bem como de os anaeróbios obrigatórios *P. gingivalis* *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. forsythia* e víruses herpéticos CMV e EBV-1 foi estatisticamente associada com a presença de gengivite. Por outro lado, em pacientes do grupo controle portadores de gengivite, a frequência de *C. rectus*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. forsythia* e víruses herpéticos CMV e EBV-1 se mostrou significativamente mais elevada do que a observada nos indivíduos periodontalmente saudáveis (**Tabela 6**).

---

**Tabela 4.** Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos estudados e víruses CMV e EBV na saliva de crianças e adolescentes com Síndrome de Down e do grupo controle.

Microrganismo	Grupos Experimentais			
	PSD <sup>1</sup>		PGC <sup>2</sup>	
	IPS <sup>3</sup> N= 18	PG <sup>4</sup> N= 32	IPS <sup>3</sup> N=24	PG <sup>4</sup> N= 26
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0 (0,0)	3 (9,38)	2 (8,33)	3 (11,54)
<i>C. rectus</i>	3 (16,67)	14 (43,75)	2 (8,33)	13 (50,0)
<i>D. pneumosintes</i>	2 (11,11)	4 (12,5)	0 (0,0)	2 (7,69)
<i>E. corrodens</i>	10 (55,55)	15 (62,5)	11 (45,83)	15 (57,69)
<i>Enterobacteriaceae</i>	5 (27,78)	9 (28,13)	3 (12,5)	2 (7,69)
<i>Enterococcus</i> sp.	5 (27,78)	11 (34,38)	2 (8,33)	4 (15,38)
<i>E. faecalis</i>	5 (27,78)	7 (21,88)	5 (20,83)	7 (26,92)
<i>F. nucleatum</i>	7 (38,89)	16 (50,0)	4 (16,67)	9 (34,62)
<i>P. gingivalis</i>	4 (22,22)	11 (34,38)	2 (8,33)	6 (23,08)
<i>P. intermedia</i>	4 (22,22)	12 (37,5)	1 (4,17)	4 (15,38)
<i>P. nigrescens</i>	3 (16,67)	8 (25,0)	0 (0,0)	3 (11,54)
<i>Pseudomonas</i> sp.	4 (22,22)	9 (28,13)	1 (4,17)	2 (7,69)
<i>P. aeruginosa</i>	3 (16,67)	5 (15,63)	1 (4,17)	2 (7,69)
<i>T. forsythia</i>	5 (27,78)	21 (65,63)	4 (16,67)	15 (57,69)
<i>T. denticola</i>	2 (11,11)	5 (15,63)	0 (0,0)	0 (0,0)
<b>Víruses</b>				
Citomegalovírus	1 (5,55)	16 (50,0)	0 (0,0)	10 (38,46)
Epstein-Barr tipo 1	0 (0,0)	18 (56,25)	0 (0,0)	14 (53,85)

<sup>1</sup>Pacientes com Síndrome de Down

<sup>2</sup>Pacientes do grupo controle

<sup>3</sup>Indivíduos periodontalmente saudáveis

<sup>4</sup>Pacientes com gengivite

**Tabela 5.** Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos estudados e víruses CMV e EBV no biofilme supragengival de crianças e adolescentes com Síndrome de Down e do grupo controle.

Microrganismo	Grupos Experimentais			
	PSD <sup>1</sup>		PGC <sup>2</sup>	
	IPS <sup>3</sup> N= 18	PG <sup>4</sup> N= 32	IPS <sup>3</sup> N=24	PG <sup>4</sup> N= 26
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0 (0,0)	4 (12,5)	2 (8,33)	3 (11,54)
<i>C. rectus</i>	6 (33,33)	20 (62,5)	5 (20,83)	9 (34,62)
<i>D. pneumosintes</i>	0 (0,0)	3 (9,38)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>E. corrodens</i>	9 (50,0)	17 (53,13)	12 (50,0)	17 (65,38)
<i>Enterobacteriaceae</i>	7 (38,89)	12 (37,5)	2 (8,33)	4 (15,38)
<i>Enterococcus spp.</i>	8 (44,44)	19 (59,38)	11 (45,83)	15 (57,69)
<i>E. faecalis</i>	6 (33,33)	13 (40,63)	8 (33,33)	11 (42,31)
<i>F. nucleatum</i>	7 (38,89)	17 (53,13)	7 (29,17)	15 (57,69)
<i>P. gingivalis</i>	5 (27,78)	11 (34,38)	3 (12,5)	11 (42,31)
<i>P. intermedia</i>	5 (27,78)	15 (46,88)	5 (20,83)	12 (46,15)
<i>P. nigrescens</i>	5 (27,78)	11 (34,38)	1 (4,17)	4 (15,38)
<i>Pseudomonas sp.</i>	4 (22,22)	11 (34,38)	1 (4,17)	3 (11,54)
<i>P. aeruginosa</i>	2 (11,11)	7 (21,88)	1 (4,17)	3 (11,54)
<i>T. forsythia</i>	6 (33,33)	19 (59,38)	10 (41,67)	23 (88,46)
<i>T. denticola</i>	2 (11,11)	5 (15,63)	0 (0,0)	4 (15,38)
<b>Viruses</b>				
Citomegalovírus	0 (0,0)	12 (37,5)	0 (0,0)	15 (57,69)
Epstein-Barr tipo 1	0 (0,0)	10 (31,25)	0 (0,0)	11 (42,31)

<sup>1</sup>Pacientes com Síndrome de Down

<sup>2</sup>Pacientes do grupo controle

<sup>3</sup>Indivíduos periodontalmente saudáveis

<sup>4</sup>Pacientes com gengivite

**Tabela 6.** Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos estudados e víruses CMV e EBV no biofilme subgengival de crianças e adolescentes com Síndrome de Down e do grupo controle.

Microrganismo	Grupos Experimentais			
	PSD <sup>1</sup>		PGC <sup>2</sup>	
	IPS <sup>3</sup> N= 18	PG <sup>4</sup> N= 32	IPS <sup>3</sup> N=24	PG <sup>4</sup> N= 26
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	1 (5,55)	8 (25,0)	3 (12,5)	4 (15,38)
<i>C. rectus</i>	8 (44,44)	14 (43,75)	4 (16,67)	14 (53,85)
<i>D. pneumosintes</i>	2 (11,11)	4 (12,5)	2 (8,33)	1 (3,85)
<i>E. corrodens</i>	10 (55,55)	22 (68,75)	9 (37,5)	24 (92,31)
<i>Enterobacteriaceae</i>	4 (22,22)	9 (28,13)	2 (8,33)	5 (19,23)
<i>Enterococcus spp.</i>	5 (27,78)	11 (34,38)	4 (16,67)	5 (19,23)
<i>E. faecalis</i>	3 (16,67)	7 (21,88)	3 (12,5)	3 (11,54)
<i>F. nucleatum</i>	7 (38,89)	13 (40,63)	4 (16,67)	14 (53,85)
<i>P. gingivalis</i>	3 (16,67)	16 (50,0)	4 (16,67)	19 (73,08)
<i>P. intermedia</i>	6 (33,33)	19 (59,38)	3 (12,5)	12 (46,15)
<i>P. nigrescens</i>	5 (27,78)	16 (50,0)	3 (12,5)	9 (34,62)
<i>Pseudomonas sp.</i>	3 (16,67)	8 (25,0)	1 (4,17)	2 (7,69)
<i>P. aeruginosa</i>	3 (16,67)	7 (21,88)	1 (4,17)	2 (7,69)
<i>T. forsythia</i>	5 (27,78)	23 (71,88)	5 (20,83)	20 (76,92)
<i>T. denticola</i>	2 (11,11)	5 (15,63)	4 (16,67)	4 (15,38)
<b>Viruses</b>				
Citomegalovírus	1 (5,55)	19 (59,38)	0 (0,0)	11 (42,31)
Epstein-Barr tipo 1	3 (16,67)	22 (68,75)	0 (0,0)	15 (57,69)

<sup>1</sup>Pacientes com Síndrome de Down

<sup>2</sup>Pacientes do grupo controle

<sup>3</sup>Indivíduos periodontalmente saudáveis

<sup>4</sup>Pacientes com gengivite

## **5 Discussão**

A Síndrome de Down está profundamente ligada a um estereótipo sobre pacientes com necessidades especiais, levando o seu portador a uma rotina com limitações adicionais. Contudo, esse preconceito parece estar sendo paulatinamente eliminado, dando espaço para posturas que buscam a inserção do indivíduo com Síndrome de Down na sociedade com o qual interage.

Essa síndrome é caracterizada pela presença de um padrão de crescimento corporal e facial particulares, com reduzido crescimento dos terço médio da face, além de uma extensa gama de alterações de desenvolvimento, como agenesia dental, cardiopatias congênitas, macroglossia, além de imunossupressão, disfunções alérgicas, e ocorrência freqüente de periodontites agressivas e maior susceptibilidade às infecções. Outras enfermidades, como diabetes tipo 1, neoplasias de tecido hematopoiético e hipotireoidismo também são mais freqüentes nesses pacientes.<sup>10</sup>

Dois enfoques diferentes relativos às condições de saúde bucal em pacientes com Síndrome de Down podem ser observados na literatura. Uma corrente de pensamento advoga que a maior susceptibilidade às doenças periodontais pode ser minimizada através de mais enfoque preventivo,<sup>43</sup> enquanto outra corrente, a qual poderia ser denominada de determinista, o “determinismo biológico” é o “determinante” das condições de saúde gengival e bucal, cabendo às filosofias preventivas um papel menos relevante e a odontologia adquire um papel mais paliativo.<sup>13</sup> Os dados do presente estudo dão suporte à primeira corrente, mostrando que, em condições de higiene, sócio-econômicas e de atenção odontológica similares, a experiência de doenças bucais não difere significativamente entre pacientes portadores de Síndrome de Down ou não.

A manutenção das condições de higiene bucal em pacientes com síndrome de Down é problemática, sendo que, mesmo com repetidas e constantes atividades de orientação e grupos

---

muito pequenos de pacientes, a presença de biofilme em mais da metade das superfícies dentais é descrita na literatura,<sup>57</sup> como também observado no presente estudo. A magnitude do acúmulo do biofilme e a influência que cuidados familiares e pessoais têm sobre esse fenômeno são controversos, com autores defendendo que esse fato é inerente à condição síndrômica e limitações que a mesma acaba produzindo,<sup>57,58</sup> enquanto a maioria da literatura evidencia que, quando esses pacientes são submetidos a uma política de acompanhamento e prevenção adequadas, os mesmos respondem favoravelmente, o mesmo ocorrendo quando o tratamento periodontal tem que ser instituído.<sup>59,60,61</sup>

Como alguns aspectos clínicos, como a presença de sangramento gengival, não foram influenciados pela frequência de escovação, uso de fio dental e escova dental, pode-se questionar a veracidade da informação fornecida pelos responsáveis das crianças e pelos adolescentes em questão, de forma que a informação, mais do que evidenciar o que de fato é realizado, possivelmente reflete o conhecimento que o indivíduo e seus responsáveis possuem e acreditam ser o ideal. Contudo, não se deve descartar a possível falta de eficiência do processo de higienização.

Mesmo com uma diminuição significativa nas populações microbianas e na frequência de detecção dos principais microrganismos associados com as periodontites, a resposta ao tratamento periodontal tende a ser precária e a inflamação se mantém persistente,<sup>57</sup> possivelmente devido à imunossupressão que muitos pacientes portadores de Síndrome de Down experimentam. Para minimizar essa problemática, deve-se dar maior importância ao diagnóstico microbiológico e clínico de forma a detectar os pacientes que apresentam maior risco de desenvolver formas mais agressivas de periodontite, como forma de atingir uma intervenção mais adequada e efetiva que previna ou, pelo menos minimize os danos aos tecidos de suporte.<sup>10</sup>

---

Assim, os mesmos grupos que atribuem maior severidade à gengivite e periodontite em pacientes com síndrome de Down, tendem a reduzir a importância dos fatores sociais no desenvolvimento dessas doenças, o que contrasta com a experiência adquirida ao longo de décadas de tratamento desses pacientes junto ao Centro de Assistência Odontológica a Portadores de Necessidades Especiais (CAOE)-UNESP.

Alguns autores alegam que as periodontites em pacientes com síndrome de Down tendem a gerar quadros mais agressivos e a inflamação se mostra mais intensa e refratária, mesmo quando esses pacientes apresentam os mesmos níveis de acúmulo de placa que pacientes não portadores de necessidades especiais e mesmo quando comparados com pacientes especiais, como aqueles portadores de paralisia cerebral.<sup>13,20,58</sup>

Por outro lado, em algumas populações humanas,<sup>4</sup> mesmo que a prevalência de perda óssea entre pacientes com Síndrome de Down seja mais elevada, a extensão da mesma é bastante modesta e o quadro periodontal pode responder ao controle de biofilme e medidas terapêuticas,<sup>60,61,62,63</sup> reduzindo o peso do determinismo biológico que muitos pais e profissionais dizem existir quanto à inevitabilidade do desenvolvimento de periodontite nesses pacientes. Contudo, uma vez que o controle do biofilme e demais procedimentos preventivos são mais críticos em pacientes com Síndrome de Down, deve-se ressaltar o papel de microrganismos específicos no biofilme desses pacientes, bem como o fato de que nenhuma das crianças e adolescentes do presente estudo apresentou perda óssea.

Estudos revelam que as gengivites e periodontites se desenvolvem precocemente em portadores de síndrome de Down,<sup>64</sup> sendo que os resultados do presente estudo, embora limitados ao universo de cinquenta pacientes, não suporta a idéia de uma maior severidade das periodontites ou gengivites entre a população portadora de Síndrome de Down.

Comparações entre os dados de ocorrência dos principais periodontopatógenos disponíveis na literatura sobre pacientes com Síndrome de Down ou não portadores da

---

síndrome e os resultados apresentados no presente estudo esbarram em limitações, que vão desde o método de detecção dos microrganismos (cultura, hibridização DNA-DNA, PCR, real-time PCR, imunofluorescência), descrição das condições periodontais das populações estudadas, características étnico-raciais das populações, forma com que os dados são apresentados, e, por fim, identidade dos microrganismos descritos na literatura. Face às profundas mudanças taxonômicas experimentadas por alguns gêneros microbianos, particularmente para as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas anaeróbias, procurou-se optar pela utilização de artigos publicados a partir de 1999, quando a identidade da maioria dos microrganismos estudados no presente estudo já estava bem estabelecida.

*A. actinomycetemcomitans* é frequentemente ligado aos quadros mais agressivos de periodontite em pacientes não portadores de Síndrome de Down,<sup>40,45</sup> mas também implicado em infecções crônicas.<sup>65,66,67</sup> Os primeiros estudos sobre a etiologia da periodontite em pacientes com Síndrome de Down implicavam esse cocobacilo, mas hoje seu papel vem sendo profundamente questionado.<sup>4,17,68,69</sup>

Os dados do presente estudo não dão suporte a um papel mais proeminente desse microaerófilo nos processos infecciosos periodontais nos grupos estudados, desde que a ocorrência do mesmo foi modesta e bastante irregular, concordando com o estudo de Hanookai et al.,<sup>19</sup> e mostrando frequências de colonização muito inferiores a observadas para indivíduos com Síndrome de Down no Japão,<sup>5,6</sup> Grécia e Holanda,<sup>20,57</sup> onde 40 a 80% desses pacientes se mostraram colonizados por esse microrganismo, enquanto no presente estudo sua prevalência variou de 0,0% a 25,0%.

Possivelmente parte dessas diferenças pode se explicar em função da faixa etária dos pacientes envolvidos, uma vez que a quase totalidade dos estudos disponíveis na literatura foi realizada com pacientes mais velhos. Quando se levanta a questão da idade dos pacientes, verifica-se que entre 8-13 anos, exatamente onde a maioria das amostras do presente estudo se

---

situa, Sakellari et al.,<sup>58</sup> encontraram uma prevalência de 25,0% para esse microaerófilo, como no presente estudo, sendo que entre adolescentes com idade entre 13 e 18 anos esse percentual se elevada para 70,0%.

Por outro lado, esse microrganismo é, dentre todos os periodontopatógenos, aquele cuja prevalência na população apresenta maior variação geográfica e influência étnico-racial,<sup>70</sup> tendo sido detectado de 35% dos pacientes norte americanos com periodontite crônica,<sup>66</sup> de 52% a 90% dos brasileiros com essa condição periodontal,<sup>34,51,71</sup> 65,5% das pacientes grávidas norte-americanas com esse tipo de periodontite,<sup>72</sup> de 76 a 93,5% dos pacientes tailandeses descritos por Hintao et al.,<sup>73</sup> e 86,4% dos mexicanos com periodontite,<sup>74</sup> além de elevada prevalência na África do Norte,<sup>22</sup> China.<sup>75,76</sup> Contudo, esses dados são relativos a pacientes não portadores da síndrome e não dispomos de dados satisfatórios sobre a ocorrência desse microrganismo em populações brasileiras com Síndrome de Down, particularmente utilizando-se de ferramentas moleculares de detecção.

Além do presente estudo, uma baixa prevalência de *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos não portadores de Síndrome de Down vem sendo descrita em lesões iniciais de periodontite, ativas e inativas e mesmo entre pacientes com periodontite no Japão (10,9%),<sup>77,78</sup> na Colômbia (5 % a 15%),<sup>40</sup> Holanda e Espanha,<sup>16,79</sup> com uma ocorrência inferior a 20% em casos de periodontite e 10% na população saudável.

Essa heterogeneidade de sua distribuição em diferentes populações humanas pode estar associada à virulência dos vários sorotipos e genótipos dessa espécie, que condicionam o tipo de interação que as mesmas estabelecem com o hospedeiro.<sup>22,80</sup> Essa característica pode ser particularmente relevante para os portadores de Síndrome de Down, os quais já apresentam certo grau de imunossupressão, que poderia ser exacerbada pelo aumento na produção da potente leucotoxina que caracteriza a virulência dessa espécie microbiana,<sup>34</sup> a

---

qual pode aumentar em 22,5 vezes o risco de perda precoce de inserção conjuntiva nos pacientes colonizados.<sup>81</sup>

Dentre os microrganismos avaliados na presente pesquisa, merece destaque *C. rectus* e *E. corrodens*, não somente pela elevada frequência de detecção, mas pelas diferentes interações observadas com o hospedeiro. Nesse sentido, embora *C. rectus* seja mais freqüente no biofilme supragengival de pacientes com síndrome de Down, o mesmo não parece estar associado ao desenvolvimento de inflamação gengival nesses pacientes, enquanto isso ocorre nos indivíduos não portadores da síndrome, a despeito de ocorrências similares no biofilme subgengival dos dois grupos de crianças e adolescentes.

Contudo, a literatura sobre o papel *C. rectus* nas doenças periodontais em indivíduos não portadores de Síndrome de Down é contraditória. Enquanto estudos evidenciam que esse microrganismo é comensal na cavidade bucal, tanto em sadios como em pacientes com periodontite e gengivite, outros, particularmente envolvendo pacientes norte-americanos, mostram baixa frequência desse microrganismo.<sup>52,66,74,82,83,84</sup> Nesse sentido, também é bastante significativa à literatura que o associa com a periodontite crônica.<sup>40,71,85,86,87</sup>

Quanto ao papel desempenhado por esse microrganismo nas gengivites e periodontites em pacientes portadores de Síndrome de Down, as mesmas contradições estão presentes. Os dados apresentados na **Tabela 6** evidenciam que *C. rectus* poderia estar associado à gengivite em não portadores da síndrome, o mesmo não ocorrendo em portadores dessa síndrome, sendo que a sua frequência de detecção se mostrou semelhante entre os grupos. A prevalência desse microaerófilo variou de 8,33% na saliva de indivíduos não portadores da síndrome a 62,5% no biofilme supragengival de pacientes com trissomia do cromossomo 21. Os valores médios obtidos se aproximam daqueles apresentados por Hanookai et al.,<sup>19</sup> Sakellari et al.,<sup>57</sup> bem como Sakellari et al.<sup>58</sup>

---

Nesse último estudo, em pacientes portadores de Síndrome de Down e periodontite, com idade superior a 13 anos, a ocorrência desse microrganismo foi muito superior ao observado no presente estudo e *C. rectus* se mostrou significativamente mais prevalente no biofilme de pacientes portadores de Síndrome de Down do que naqueles que apresentavam paralisia cerebral ou não apresentavam anormalidades neurológicas. Em pacientes mais jovens, os autores não observaram essas diferenças.

Por outro lado, em pacientes japoneses com Síndrome de Down, independentemente do fator idade, *C. rectus* se mostra muito mais prevalente em comparação com os resultados apresentados nas **Tabelas 5 e 6**. Outros estudos como o de Hanookai et al.,<sup>19</sup> também observaram uma prevalência menor desse microrganismo, sem que nenhuma relação com as características clínicas dos pacientes portadores de Síndrome de Down tenha sido observada.

Amano et al.,<sup>5</sup> com crianças de dois a treze anos, evidenciaram que, entre 5 e 7 anos, bem como entre 11 e 13 anos, *E. corrodens* é significativamente mais prevalente em crianças portadoras de Síndrome de Down, quando comparadas com as crianças do grupo controle, não portadoras da síndrome em questão. Contudo o papel desempenhado por esse microrganismo nas alterações inflamatórias periodontais não é esclarecido. No presente estudo, esse microrganismo foi freqüentemente detectado, particularmente entre as crianças e adolescentes com maior acúmulo de placa, independente da presença ou não da Síndrome de Down, como também observado por Amano et al.,<sup>6</sup> e Sakelari et al.,<sup>58</sup> sendo que essa prevalência foi muito superior à observada por Hanookai et al.<sup>19</sup>

Outros estudos suportam um papel mais significativo desse microrganismo nas doenças periodontais crônicas ou agressivas,<sup>71,72,82,88</sup> em pacientes não portadores de Síndrome de Down. Nesse particular, *E. corrodens* esteve associado à gengivite entre esses pacientes, como observado na **Tabela 6**, mas o mesmo não foi observado para os pacientes portadores dessa síndrome.

---

A despeito de uma possível associação entre *D. pneumosintes* e outras espécies desse gênero com doença periodontal, como descrito na literatura,<sup>52,82,89,90,91</sup> o presente estudo parece ser a primeira descrição da ocorrência desse anaeróbio obrigatório em pacientes portadores de Síndrome de Down. Nesse particular, os resultados apresentados não suportam um papel significativo para esse anaeróbio na gengivite e o mesmo foi raramente detectado no biofilme e saliva das crianças e adolescentes de ambos os grupos, tampouco foram verificadas quaisquer relações entre a presença dessa espécie e características clínicas desses pacientes.

Assim, a ocorrência do gênero *Dialister* na cavidade bucal necessita ser mais bem avaliada, visto que alguns estudos, como o de Persson et al.,<sup>72</sup> evidenciam prevalência de 46,5% em pacientes grávidas portadoras de periodontite e o mesmo também se mostrou associado ao desenvolvimento de gengivite, sendo que outros mostram relação de espécies desse gênero com sítios ativos de periodontite inicial ou periodontite severa,<sup>77,89</sup> ou são encontrados em frequência muito baixa ou sequer são detectados.<sup>86,88</sup>

Dentre os principais microrganismos detectados nas amostras, *F. nucleatum* é de extrema importância para a formação do biofilme microbiano, em função de sua capacidade ímpar de aderir nos tecidos do hospedeiro e de co-agregar com a maioria dos demais microrganismos bucais, notadamente os colonizadores finais do biofilme, os quais são os mais frequentemente associados aos quadros infecciosos periodontais. Entretanto, da mesma forma que *C. rectus* e *E. corrodens*, no presente estudo, *F. nucleatum* foi associado ao sangramento gengival e gengivite apenas nas crianças e adolescentes não portadores de Síndrome de Down.

Além desse aspecto, a elevada prevalência desse anaeróbio fusiforme está de acordo com a literatura sobre pacientes portadores de Síndrome de Down,<sup>58</sup> mas essa última é extremamente pobre. Alguns autores advogam que esse anaeróbio pode exacerbar o risco de perda óssea em pacientes com síndrome de Down,<sup>20</sup> mas não discorrem sobre os mecanismos

---

envolvidos, embora se saiba que sua capacidade de induzir respostas inflamatórias é bastante significativa.<sup>38</sup>

Os anaeróbios Gram-negativos produtores de pigmento preto dos gêneros *Prevotella* e *Porphyromonas*, embora não tenham apresentado diferenças significativas em sua prevalência nos dois grupos de crianças e adolescentes, estiveram associados ao sangramento gengival e presença de gengivite, quase sempre associados a *T. forsythia* e aos vírus EBV-1 e CMV.

A participação de *P. gingivalis* e *T. forsythia* nas infecções periodontais vem sendo confirmada em diferentes populações ao redor do mundo, como Estados Unidos,<sup>66,72</sup> Colômbia,<sup>40</sup> Japão,<sup>52,78</sup> Suécia,<sup>86</sup> Holanda e Brasil,<sup>71,79</sup> sendo que o mesmo foi confirmado para os pacientes portadores de síndrome de Down.<sup>6,19,20</sup>

No presente estudo não foram observadas diferenças entre a prevalência desses dois anaeróbios obrigatórios, nos indivíduos portadores ou não de Síndrome de Down, sendo que nesse sentido a própria literatura apresenta dados conflitantes: enquanto Amano et al.,<sup>5</sup> observaram que esses microrganismos eram mais frequentes em pacientes portadores de Síndrome de Down com a mesma condição periodontal de indivíduos não portadores da síndrome, Amano et al.,<sup>6</sup> verificaram que essas diferenças desapareciam quando os dados dos portadores de Síndrome de Down eram comparados com outros pacientes com necessidades especiais, como os portadores de paralisia cerebral, enquanto Sakellari et al.,<sup>58</sup> mostraram que na faixa etária de 8-13 anos a prevalência de *T. forsythia* é maior em portadores de síndrome de Down, enquanto, no grupo de 13-19 anos, esse anaeróbio bem como *P. gingivalis* e *P. intermedia* seriam mais prevalentes e mostraria maior população.

No biofilme subgengival, observou-se uma maior ocorrência de *P. intermedia* em indivíduos portadores de Síndrome de Down periodontalmente saudáveis, quando comparada com os indivíduos do grupo controle com essa mesma condição periodontal, sendo que esse anaeróbio esteve associado à inflamação gengival nos dois grupos experimentais. Esses dados

---

são de interesse em função do fato de que a parcela significativa da literatura sobre a microbiota associada às gengivites e periodontites em indivíduos portadores de Síndrome de Down sustenta que esse microrganismo está ligado à perda óssea e,<sup>5,19</sup> pode ser mais freqüente em portadores dessa condição especial.<sup>58</sup>

Para *P. nigrescens*, da mesma forma que *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *T. forsythia*, observou-se relação com gengivite e sangramento à sondagem, mas esse fenômeno se manifestou nos dois grupos de crianças e adolescentes, indistintamente. Em pacientes portadores de Síndrome de Down, esse anaeróbio parece ser mais prevalente do que em indivíduos não portadores da síndrome,<sup>5</sup> mas essas diferenças são minimizadas quando os pacientes não portadores de Síndrome de Down possuem paralisia cerebral ou outra condição que dificulta a utilização de dispositivos associados à higiene bucal.<sup>6,58</sup> Entretanto, não se pode esquecer que a ocorrência desse anaeróbio é extremamente variável de acordo com a área geográfica.<sup>40</sup>

O papel das espiroquetas bucais no desenvolvimento das reações inflamatórias periodontais, bem como a perda óssea, vem sendo estudado desde a década de 60. Estudos realizados principalmente na Europa Ocidental, Estado Unidos, Japão, sudeste asiático e Brasil evidenciaram que *Treponema denticola*,<sup>52,66,71,73,78,82,86,92,93</sup> a espiroqueta bucal mais amplamente estudada, apresenta relação com a perda de inserção conjuntiva e é detectada em freqüência muito superior nos pacientes com periodontite ativa.

Entretanto, em pacientes portadores de síndrome de Down os dados sobre esses microrganismos são bastante escassos. Segundo Amano et al.,<sup>5</sup> *T. denticola* é muito mais numeroso nos pacientes com Síndrome de Down, mesmo a partir de 2 anos de idade, podendo colonizar até 70% desses pacientes, enquanto Amano et al.,<sup>6</sup> não observaram diferenças entre esses pacientes e outros pacientes com problemas mentais. Os dados do presente estudo mostram que, na população estudada, *T. denticola* é muito pouco freqüente, sem apresentar

---

relação com nenhuma condição clínica nas crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down ou do grupo controle, sendo que essa característica vem se mostrando freqüente também em outros grupos de pacientes do interior brasileiro (resultados ainda não publicados).

De forma geral, em pacientes não portadores de Síndrome de Down, a presença de víruses herpéticos em um sítio periodontal está associada a níveis elevados de bactérias implicadas na patogênese das periodontites, como *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *D. pneumosintes* / *D. invisus*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. denticola*, *C. rectus* e *A. actinomycetemcomitans*,<sup>91,94,95</sup> sendo que a associação com *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* pode estar associada ao desenvolvimento da periodontite agressiva em algumas populações.<sup>96</sup>

Para crianças e adolescentes com Síndrome de Down, clinicamente saudáveis ou portadores de gengivite leve ou moderada, os dados referentes à ocorrência de citomegalovírus e vírus Epstein-Barr se limitam ao estudo Hanookai et al.,<sup>19</sup> avaliaram a ocorrência desses víruses e dos principais periodontopatógenos em bolsas periodontais profundas e sulcos gengivais inflamados, verificando que EBV e CMV estavam presentes em 32,0% e 26,0% dos pacientes com bolsa periodontal entre 4 e 8 mm de profundidade, respectivamente, praticamente não sendo detectado de sítios periodontais com profundidade inferior a 3 mm. No presente estudo, a presença de CMV e EBV foi associada á gengivite e esses víruses estiveram freqüentemente associados aos anaeróbios obrigatórios produtores de pigmento preto, tanto nos pacientes portadores de Síndrome de Down quanto entre os pacientes do grupo controle.

Os víruses herpéticos em geral e os víruses CMV e EBV em particular podem predispor à ocorrência de infecções bacterianas em indivíduos infectados, tanto por facilitar a exposição de novos receptores na superfície das células do hospedeiro, quanto por induzir a

---

liberação precoce de IL-10 por monócitos, o que reduziria a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade do tipo II, associadas à apresentação de antígenos, além de reduzir a atividade oxidativa de leucócitos, bem como a capacidade de fagocitose dos mesmos, além de induzir a liberação de IL-6 por fibroblastos e IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  a partir de monócitos,<sup>96,97,98</sup> além de outros peptídeos com atividade pró-inflamatória.<sup>27,41</sup>

Além desse aspecto, não apenas a reativação do vírus CMV pode estar associada à destruição periodontal. Sugano et al.,<sup>99</sup> evidenciaram que a reativação do vírus EBV criaria condições ideais para a proliferação de *P. gingivalis*, principalmente através de inibir os mecanismos protetores do hospedeiro, ao mesmo tempo em que extratos desse anaeróbio são capazes de induzir a reativação viral em linfócitos B.

A presença de infecção periodontal por EBV e CMV simultaneamente está particularmente associada às modalidades mais agressivas de periodontite, principalmente por permitir a reativação de outras infecções latentes, em especial dos demais víruses herpéticos, além de aumentar significativamente a proporção de linfócitos T8 citotóxicos/supressores nos tecidos periodontais, além de reduzir o número de linfócitos T4 auxiliares, o que levariam a uma significativa imunossupressão das defesas periodontais, o que poderia facilitar a implantação de periodontopatógenos.<sup>27</sup> Considerando-se que as condições de reatividade imunológica dos pacientes com Síndrome de Down podem ser precárias, essas potencialidades biológicas desses víruses ganham novos contornos.

Os resultados do presente estudo também sugerem que as lesões periodontais nos pacientes com gengivite são as principais fontes de víruses de CMV e EBV presentes na saliva, uma vez que as crianças e adolescentes periodontalmente saudáveis, independentemente de serem ou não pacientes portadores de Síndrome de Down, praticamente não possuíam DNA desses agentes infecciosos na saliva ou biofilme, como inicialmente sugerido por Saygun et al.,<sup>100</sup> para pacientes não portadores de Síndrome de

---

Down. Entretanto, o papel desempenhado por esses vírus necessita de maiores esclarecimentos, posto que a presença dos mesmos nos tecidos periodontais pode não estar necessariamente ligada à origem da patologia, mas sim refletir a presença de mais sangue no sulco gengival inflamado, quando comparado com indivíduos sadios, ou mesmo a presença de linfócitos infectados com esses vírus nesses tecidos periodontais.<sup>101</sup>

*Enterobacteriaceae* e outros microrganismos entéricos, bem como os pseudomonados, não são considerados como parte relevante da microbiota bucal, mas desequilíbrios nessa mesma microbiota podem criar condições favoráveis para a implantação desses microrganismos no biofilme.<sup>33,34</sup> Além desse aspecto falta de higiene, problemas no tratamento de água e esgoto de uma comunidade podem colaborar para a presença desses microrganismos na cavidade bucal.<sup>35</sup>

Esses microrganismos ainda podem se converter em reservatórios de genes de resistência a antimicrobianos, que podem ser disseminados para os demais microrganismos do biofilme.<sup>32</sup> Por outro lado, a literatura sobre a participação desses microrganismos no desenvolvimento das doenças periodontais e,<sup>33,102</sup> nas estomatites bucais ainda é precária,<sup>36,103</sup> particularmente em indivíduos com síndrome de Down, onde apenas um estudo avalia essa questão nesse grupo de pacientes.

Por outro lado, a colonização da orofaringe por membros da família *Enterobacteriaceae* parece ser o principal fator associado à pneumonia por aspiração em indivíduos idosos ou imunologicamente debilitados,<sup>104,105</sup> podendo representar risco de infecções sistêmicas.<sup>36</sup>

Os resultados do presente estudo evidenciaram que, a despeito da microbiota anaeróbia e microaerófila entre os portadores de síndrome de Down se apresentar semelhante à observada em crianças e adolescentes não portadores da síndrome, de forma que a condição clínica gengival tenha se mostrado um determinante mais relevante para a presença desses

---

microrganismos, o mesmo não é válido para a família *Enterobacteriaceae*, onde os portadores de Síndrome de Down, independentemente de condição social, higiene bucal e condição gengival, apresentaram uma frequência estatisticamente superior desses microrganismos quando comparados com o grupo controle. Essa maior ocorrência não se limita ao sulco gengival, mas também se apresenta na saliva e biofilme supragengival.

A participação de membros das famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* na microbiota bucal de pacientes portadores de Síndrome de Down ainda não foi esclarecida. Na literatura consultada, apenas Hanoakai et al.,<sup>19</sup> parecem ter procurado avaliar o papel desses microrganismos em pacientes portadores de Síndrome de Down com periodontite e gengivite, detectando bastonetes Gram-negativos entéricos de 11 a 16% dos mesmos, sendo que o tratamento periodontal não afetou significativamente a ocorrência ou população dos mesmos.

Nesse sentido, embora tenha sido observada uma maior ocorrência de pseudomonados no biofilme de pacientes portadores de Síndrome de Down com gengivite, essa associação pode ser mais consequência das alterações gengivais e não sua causa, visto que esses microrganismos geralmente estão presentes em baixas proporções no biofilme e, em função de seu metabolismo mais associado ao oxigênio molecular, possivelmente a área do sulco gengival mais frequentemente colonizada por esses bastonetes deva ser a margem gengival.

Nessa região anatômica se mostra como a área onde os nutrientes exteriorizados através do fluido do sulco gengival ou oriundos da saliva/dieta podem chegar rapidamente e onde o oxigênio molecular estão disponíveis em concentrações menos favoráveis aos anaeróbios obrigatórios. Apesar desse fato, pouco se sabe sobre como o arsenal de fatores de virulência desses pseudomonados atua sobre os tecidos periodontais e novos estudos são necessários para caracterizar esse fenômeno.

É possível, se não provável, que, nos pacientes com Síndrome de Down, a menor reatividade imunológica poderia criar condições para as implantações orais desses

---

microrganismos, que são oportunistas e de distribuição ubíqua no ambiente. Contudo, deve-se considerar que pacientes com diferentes alterações neurológicas por vezes albergam essas bactérias na cavidade bucal em função de auto-inoculação, o que se daria de forma freqüente,<sup>104</sup> de forma que se deve procurar monitorar e melhorar as condições de sanidade do ambientes onde esses pacientes vivem.

Na odontologia, o papel de microrganismos superinfectantes tem merecido grande destaque, particularmente quando esses microrganismos estão envolvidos em infecções refratárias á maioria das modalidades terapêuticas disponíveis, como ocorre com as infecções nosocomiais, endodônticas, periapicais e periodontais associadas ao gênero *Enterococcus*.<sup>106</sup> Dentre as espécies desse gênero, destaca-se *E. faecalis* pela sua resistência aos antimicrobianos e antibióticos, bem como pela sua prevalência na cavidade bucal.<sup>16,101,106</sup> Entretanto, pouco se conhece sobre a distribuição desses microrganismos em pacientes portadores de Síndrome de Down, particularmente em crianças e adolescentes. Nesse sentido, não foram detectadas quaisquer referências sobre a colonização da cavidade bucal por esses microrganismos nessa população na literatura consultada.

Os resultados das **Tabelas 4, 5 e 6** sugerem que o habitat principal de *Enterococcus* sp. e *E. faecalis*, na cavidade bucal, é o biofilme supragengival e não se pode esquecer que esse ambiente é fonte de recolonização do sulco gengival e de contaminação para a saliva em indivíduos portadores da Síndrome de Down e não portadores.<sup>57,107</sup>

*Enterococcus faecalis* e outros microrganismos entéricos têm sido associados a periodontite em pacientes grávidas,<sup>72</sup> periodontite crônica em populações brasileiras e,<sup>102,106</sup> outros povos latino-americanos.<sup>16,88</sup> Entretanto, os dados aqui apresentados não evidenciam qualquer correlação entre os parâmetros clínicos gengivais e periodontais e a ocorrência dos enterococos, tanto no grupo de crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down, quanto no grupo controle.

---

## 6 Conclusões

A análise dos dados permitiu que as seguintes conclusões viessem a ser formuladas:

a) a ocorrência das espécies microbianas anaeróbias e microaerófilas mais associadas ao ambiente periodontal foi semelhante nos dois grupos de crianças e adolescentes, independentemente da condição gengival;

b) apenas *P. intermedia* e *Enterobacteriaceae* foram observadas com maior frequência na saliva dos indivíduos portadores de Síndrome de Down;

c) nas amostras de biofilme supragengival, observou-se maior ocorrência de *Enterobacteriaceae*, *C. rectus*, *P. nigrescens* e gênero *Pseudomonas* nos pacientes portadores de Síndrome de Down;

d) os dados referentes ao biofilme subgengival revelaram uma maior ocorrência de *P. intermedia* em indivíduos portadores de Síndrome de Down periodontalmente saudáveis, enquanto o gênero *Pseudomonas* se mostrou mais prevalente em crianças portadoras de Síndrome de Down com gengivite;

e) nas crianças e adolescentes portadores de Síndrome de Down, a ocorrência da família *Enterobacteriaceae*, bem como os anaeróbios obrigatórios *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. forsythia*, além dos vírus herpéticos CMV e EBV-1 e bactérias do gênero *Pseudomonas*, foi estatisticamente associada com a presença de gengivite;

f) em pacientes não portadores de Síndrome de Down portadores de gengivite, a frequência de *C. rectus*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. forsythia* e vírus herpéticos CMV e EBV-1 se mostrou significativamente mais elevada do que a observada nos indivíduos periodontalmente saudáveis;

g) nenhuma das manifestações bucais da Síndrome de Down se mostrou estatisticamente associada à ocorrência dos diferentes tipos de microrganismo.

---

---

## Referências

- 1- Thompson M. W. Genetics in medicine. 5 th ed., W. B. Saunders Co., Philedelphin;1991.p.219.
- 2- Pueschel SM, Annerén G, Durlach R, Flores J, Sustrová M, Verma IC. Medical care in Down Syndrome. *Acta Paediatr* 1995;**84**:823-7.
- 3- Cogolu D, Sabah E, Kutukculer N, Ozkinay F. Evaluation of the relationship between caries índices and salivary secretory IgA, salivary ph, buffering capacity and flow rate in children with Down syndrome. *Arch of Oral Biol* 2006;**51**:23-8.
- 4- Barr-Agholme M, Dahllöf G, Modéer T. Changes of periodontal status in patients with Down syndrome during a 7-year period. *Eur. J. Oral Sci* 1999;**107**:82-8.
- 5- Amano A, Kishima T, Kimura S, Takigushi M, Ooshima T, Hamada S, et al. Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. *J. Periodontol* 2000;**71**:249-55.
- 6- Amano AT, Akiyama S, Nakagawa I, Hamada S, Morisaki I. Relationship of periodontopathic bacteria with Early- Onset Periodontitis in Down's Syndrome. *J Periodontol* 2001;**72**:368-73.
- 7- Siqueira WL, Bermejo PR, Mustacchi Z, Nicolau J. Buffer capacity, pH, and flow rate in saliva of children aged 2-60 months with Down syndrome. *Clin Oral Invest* 2005;**9**:26-9.
- 8- Davila ME, Gil M, Daza D, Bullones y X, Ugel E. Dental caries amongst mentally retarded people and those suffering from Down's Syndrome. *Revist Salud Public* 2006;**8**: 207-13.
- 9- Elward AM, Fraser VJ. Risk factors for nosocomial primary blood stream infection in pediatric intensive care unit patients: a 2 years prospective cohort study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006;**27**:553-60.
- 10- Amano A, Murakami J, Akiyama S, Morisaki I. Etiologic factors of early-onset periodontal disease in Down syndrome. *Jap. Dental Sci. Rev* 2008;**44**:118-27.

- 11- Kroll RG, Budnik J, Kobren A. Incidence of Dental caries and Periodontal disease in Down's Syndrome. *NY State Dent J* 1970;**36**:151-6.
- 12- Bradley C, McAlister T. The oral health of children with Down Syndrome in Ireland. *Spec Care Dentist* 2004;**24**:55-60.
- 13- Zigmond M, Stabholz A, Shapira J, Bachrach G, Chaushu G, Becker A, et al. The outcome of a preventive dental care programme on the prevalence of localized aggressive periodontitis in Down's syndrome individuals. *J Intellect Disabil Res* 2006;**50**:492-500.
- 14- Feng Z, Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology 2000* 2006;**40**:50-76.
- 15- Kilian M , Frandsen EV, Haubek D, Poulsen K. The etiology of periodontal disease revisited by population genetic analysis. *Periodontology 2000* 2006;**42**:158-79.
- 16- Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, et al. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J. Clin. Periodontol* 2008;**35**:106-13.
- 17- Morinushi T, Lopatin DE, Van Poperin N. The relationship between gingivitis and the serum antibodies to the microbiota associate with periodontal disease in children with Down's Syndrome. *J. Periodontol* 1997;**68**:626-31.
- 18- Morinushi T, Lopatin DE, Nakao R, Kinjyo S. A comparison of the gingival health of children with Down syndrome to health children residing in an Institution. *Spec Care Dentist* 2006;**26**:13-9.
- 19- Hanookai D, Nowzari H, Contreras A, Morrison JL, Slots J. Herpesviruses and periodontopathic bacteria in Trisomy 21 periodontitis. *J Periodontol.* 2000;**71**:376-84.
- 20- Reuland-Bosma W, Van der Reijden WA, Van Winkelhoff AJ: Absence of a specific subgingival microflora in adults with Down's syndrome. *J. Clin. Periodontol* 2001;**28**:1004-9.

- 21- Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J. Clin. Periodontol* 2004;**31**:996-1002.
- 22- Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* 2008;**371**:237-42.
- 23- Sabeti M, Valles Y, Nowzari H, Simon JH, Kermani-Arab V, Slots J. Cytomegalovirus and Epstein–Barr virus DNA transcription in endodontic symptomatic lesions. *Oral Microbio. Immunol* 2003;**18**:104-8.
- 24- Yildirim S, Yapar M, Kubar A. Detection and quantification of herpesviruses in Kostmann syndrome periodontitis using real-time polymerase chain reaction: a case report. *Oral Microbiol. Immunol* 2006;**21**:73-8.
- 25- Andric M, Milasin J, Jovanovic T, Todorovic L. Human cytomegalovirus is present in odontogenic cysts. *Oral Microbiol. Immunol* 2007;**22**:347-51.
- 26- Imbronito AV, Okuda OS, Maria de Freitas N, Moreira Lotufo RF, Nunes FD. Detection of herpesviruses and periodontal pathogens in subgingival plaque of patients with chronic periodontitis, generalized aggressive periodontitis, or gingivitis. *J. Periodontol* 2008;**79**:2313-21.
- 27- Slots J, Saygun I, Sabeti M, Kubar A. Epstein-Barr virus in oral diseases. *J. Periodont. Res* 2006;**41**:235-44.
- 28- Diz Dios P, Feijoo J, Alvarez FJ, Castro M, Varela J. Oral *Enterobacteriaceae* in HIV patients. *I International Conference of AIDS*, Berlin, Ger, 1993:436.
- 29- Oliveira LF, Jorge AOC, Santos SSF. *In vitro* minocycline activity on superinfecting microorganisms isolated from chronic periodontitis patients. *Braz Oral Res* 2006;**20**:202-6.

- 30- Souto R, Andrade AFB, Uzeda M, Colombo APV. Prevalence of “non-oral” pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. *Braz J Microbiol* 2006;**37**:208-15.
- 31- Aas JA, Barbuto SM, Alpagot T, Olsen I, Dewhirst F.E, Paster BJ. Subgingival plaque microbiota in HIV positive patients. *J Clin Periodontol* 2007;**34**:189-95.
- 32- Gonçalves MO, Coutinho-Filho WP, Pimenta FP, Pereira GA, Pereira JA, Mattos-Guaraldi AL, et al. Periodontal disease as reservoir for multi-resistant and hydrolytic enterobacterial species. *Lett. Appl. Microbiol* 2007;**44**:488-94.
- 33- Gaetti-Jardim JR E, Marcelino SL, Sukekava F. Occurrence of yeasts, enterococci and other enteric bacteria in subgingival biofilm of HIV-positive patients with chronic gingivitis and necrotizing periodontitis. *Braz. J. Microbiol* 2008;**39**:257-61.
- 34- Gaetti-Jardim JR E, Marcelino SL, Sukekava F. Ocorrência de bactérias entéricas em amostras de biofilme subgingival de pacientes com gengivite, periodontite crônica ou periodontite agressiva. *Rev. Periodontia* 2008;**18**:92-8.
- 35- Slots J, Rams TE, Feik D, Taveras HD, Gillespie GM. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. *J. Periodontol* 1991;**62**:543-7.
- 36- Daniluk T, Fiedoruk K, Sciepek M, Zaremba ML, Rozkiewicz D, Cylwik-Rokicka D, et al. Aerobic bacteria in the oral cavity of patients with removable dentures. *Adv. Med. Sci* 2006;**51**:86-90.
- 37- Lee Sr, Knon HK, Song KB, Choi YH. Dental caries and salivary immunoglobulin A in Down Syndrome children. *J. Pediatr Child Health* 2004;**40**:530-3.
- 38- Paula MO, Gaetti-Jardim Jr E, Avila-Campos M J. Plasmid profile in oral *Fusobacterium nucleatum* from humans and *Cebus apella* monkeys. *Rev. Inst. Méd. Trop. de São Paulo* 2003;**45**:5-9.

- 39- Jervoe-Storm PM, AlAhdab H, Semaan E, Fimmers R, Jepsen S. Microbiological outcomes of quadrant versus full-mouth root planing as monitored by real-time PCR. *J. Clin. Periodontol* 2007;**34**:156-63.
- 40- Lafaurie GI, Contreras A, Barón A, Botero J, Mayorga-Fayad I, Jaramillo A, et al. Demographic, clinical and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. *J. Periodontol* 2007;**78**:629-39.
- 41- Botero JE, Vidal C, Contreras A, Parra B. Comparison of nested polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR and viral culture for the detection of cytomegalovirus in subgingival samples. *Oral Microbiol. Immunol* 2008;**23**:239-44.
- 42- Saygun I, Kubar A, Ozdemir A, Slots J. Periodontitis lesions are a source of salivary cytomegalovirus and Epstein-Barr virus. *J. Periodont. Res* 2005;**40**:187-91.
- 43- Bekhit SSA. Comments on: M. Zigmond et al. (2006) The outcome of a preventive dental care programme on the prevalence of localized aggressive periodontitis in Down's syndrome (DS) individuals (*J. Intellect. Dis. Res*;50:492-500). *J. Intellect. Dis. Res* 2008;**52**:89-90.
- 44- Hansen T, Kunkel M, Kirkpatrick CJ, Weber A. *Actinomyces* in infected osteoradionecrosis- underestimated?, *Human Pathology* 2006;**37**:61-7.
- 45- Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol* 2005;**32**:860-6.
- 46- Guebur MI, Rapoport A, Sassi LM, Oliveira BV, Pereira JCG, Ramos GHA. Alterações de fluxo salivar não estimulado em pacientes portadores de carcinoma espinocelular de boca e orofaringe submetidos á radioterapia por hiperfracionamento. *Rev Bras Cancerol* 2004;**50**:103-8.

- 47- Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int. Dent. J* 1975;**25**:229-35.
- 48- Slots J. Salient biochemical characters of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Arch. Microbiol* 1982;**131**:60-7.
- 49- Ashimoto A, Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol* 1996;**11**:266-73.
- 50- Doan N, Contreras A, Flynn J, Slots J, Chen C. Molecular identification of *Dialister pneumosintes* in subgingival plaque of humans. *J. Clin. Microbiol* 2000;**38**:3043-7.
- 51- Avila-Campos MJ, Velásquez-Melendez G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 2002;**44**:1-5.
- 52- Mayanagi G, Sato T, Shimauchi H, Takahashi N. Detection frequency of periodontitis associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. *Oral Microbiol. Immunol* 2004;**19**:379-85.
- 53- Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol* 2004;**42**:2074-9.
- 54- Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined signs in Italian patients. *Oral Microbiol. Immunol* 2005;**20**:289-95.
- 55- Fenollar F, Roux V, Stein A, Drancourt M, Raoult D. Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. *J. Clin. Microbiol* 2006;**44**:1018-28.

- 56- Imbronito AV, Grande SR, Freitas NM, Okuda O, Lotufo RF, Nunes FD. Detection of Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in blood and oral samples : comparison of three sampling methods. *J. Oral. Sci* 2008;**50**:25-31.
- 57- Sakellari D, Belibasakis G, Chadjipadelis T, Arapostathis K, Konstantinidis A. Supragingival and subgingival microbiota of adult patients with Down's syndrome. Changes after periodontal treatment. *Oral Microbiol. Immunol* 2001;**16**:376-82.
- 58- Sakellari D, Arapostathis KN, Konstantinidis A. Periodontal conditions and subgingival microflora in Down syndrome patients. A case-control study. *J. Clin. Periodontol* 2005;**32**:684-90.
- 59- Stabholz A, Babayof I, Man J. The clinical effect of a newly designed electric toothbrush on supragingival plaque, gingivitis and gingival bleeding. *J. Clin Dent* 1996;**7**:17-20.
- 60- Cichon P, Crawford L & Grimm WD. Early-onset periodontitis associated with Down's syndrome – clinical interventional study. *Annals of Periodontology* 1998;**3**:370-80.
- 61- Henequim M, Veyrone IL, Bourdiol P. Significance of oral health in persons with Down Síndrome: a literatura review: *Developmental Medicine e Chile Neurology* 1999;**41**:275-83.
- 62- Stabholz A, Shapira J, Shur D, Friedman M, Guberman R & Sela MN. Local application of sustained-release delivery system of chlorhexidine in Down's syndrome population. *Clinical Preventive Dentistry* 1991;**13**:9-14.
- 63- Shapira J & Stabholz A. A comprehensive 30-month preventive dental health program in a pre-adolescent population with Down's syndrome: a longitudinal study. *Spec Care in Dentistry* 1996;**16**:33-7.

- 64- Morinushi T, Lopatin DE, Tanaka H. The relationship between dental caries in the primary dentition and anti *S. mutans* serum antibodies in children with Down's Syndrome. *J. Clin Pediatr Dent* 1995;**19**:279-84.
- 65- Timmerman MF, Van der Weijden GA, Arief EM, Armand S, Abbas F, Winkel EG, et al. Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Subgingival microbiota in relation to experienced progression of periodontitis. *J. Clin. Periodontol* 2001;**28**:617-27.
- 66- Ebersole JL, Holt SC, Hansard R, Novak MJ. Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in hispanic Americans with type 2 diabetes. *J. Periodontol* 2008;**79**:637-46.
- 67- Gaetti-Jardim JR E, Wahasugui TC, Tomazinho PH, Marques MM, Nakano V, Avila-Campos MJ. Distribution of biotypes and leukotoxic activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolated from Brazilian patients with chronic periodontitis. *Braz. J. Microbiol* 2008;**39**:658-63.
- 68- Modéer T, Barr M, Dahllöf G. Periodontal disease in children with Down's syndrome. *Scand. J. Dent. Res* 1990;**98**:228-34.
- 69- Barr-Agholme M, Dahllöf G, Linder L, Modéer T. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque of adolescents with Down's syndrome. *Oral Microbiol. Immunol* 1992;**7**:244-8.
- 70- Rylev M, Kilian M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *J. Clin. Periodontol* 2008;**35**:346-61.
- 71- Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Rosalém W, Mendes MC, Souto RM, et al. Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9 month results. *J. Periodontol* 2005;**76**:778-84.

- 72- Persson GR, Hitti J, Paul K, Hirschi R, Weibel M, Rothen M, et al. *Tannerella forsythia* and *Pseudomonas aeruginosa* in subgingival bacterial samples from parous women. *J. Periodontol* 2008;**79**:508-16.
- 73- Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Ratarasan C, Dahlen G. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiol. Immunol* 2007;**22**:175-81.
- 74- Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Sanchez-Vargas LO, Alcantara-Maruri E. Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. *J. Periodontol* 2006;**77**:460-71.
- 75- Tong KS, Zee KY, Lee DH, Corbet EF. Clinical responses to mechanical periodontal treatment in Chinese chronic periodontitis patients with and without *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol* 2003;**74**:1582-8.
- 76- Wu YM, Yan J, Ojcius DM, Chen LL, Gu ZY, Pan JP. Correlation between infections with different genotypes of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in subgingival samples and periodontal status of patients. *J. Clin. Microbiol* 2007;**45**:3665-70.
- 77- Tanner AC, Kent R Jr, Kanasi E, Lu SC, Paster BJ, Sonis ST, et al. Clinical characteristics and microbiota of progressing slight chronic periodontitis in adults. *J. Clin. Periodontol* 2007;**34**:917-30.
- 78- Eguchi T, Koshy G, Umeda M, Iwanami T, Suga J, Nomura Y, et al. Microbial changes in patients with acute periodontal abscess after treatment detected by Pado Test. *Oral Dis* 2008;**14**:180-4.
- 79- Boutaga K, Van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J. Clin. Periodontol* 2006;**33**:427-33.

- 80- Thiha K, Takeuchi Y, Umeda M, Huang Y, Ohnishi M, Ishikawa I. Identification of periodontopathic bacteria in gingival tissue of Japanese periodontitis patients. *Oral Microbiol. Immunol* 2007;**22**:201-7.
- 81- Bueno LC, Mayer MP, Diriengo JM. Relationship between conversión of localizad juvenile periodontitis susceptible children from health to disease and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotocin promoter structure. *J. Periodontol* 1998;**69**:998-1007.
- 82- Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J. Dent. Res* 2003;**82**:338-44.
- 83- Suda R, Kobayashi M, Nanba R, Iwamaru M, Hayashi Y, Lai CH, et al. Possible periodontal pathogens associated with clinical symptoms of periodontal disease in Japanese high school students. *J. Periodont* 2004;**75**:1084-9.
- 84- Haffajee A, Tele RP, Socransky SS. Association of *Eubacterium nodatum* and *Treponema denticola* with human periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol* 2006;**21**:269-82.
- 85- Dogan B, Antinheimo J, Cetiner D, Bodur A, Emingil G, Buduneli E, et al. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. *J. Periodontol* 2003;**74**:803-14.
- 86- Dahlén, G, Leonhardt A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol. Immunol* 2006;**21**:6-11.
- 87- Yokoyama M, Hinode D, Yoshioka M, Fukui M, Tanabe S, Grenier D, et al. Relationship between *Campylobacter rectus* and periodontal status during pregnancy. *Oral Microbiol. Immunol* 2008;**23**:55-9.
- 88- Botero JE, Parra B, Jaramillo A, Contreras A. Subgingival human cytomegalovirus correlates with increased clinical periodontal parameters and bacterial coinfection in periodontitis. *J. Periodontol* 2007;**78**:2303-10.

- 89- Contreras A, Doan N, Chen C, Rusitanonta T, Flynn MJ, Slots J. Importance of *Dialister pneumosintes* in human periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol* 2000;**15**:269-72.
- 90- Ghayoumi N, Chen C, Slots J. *Dialister pneumosintes*, a new putative periodontal pathogen. *J. Periodont. Res* 2002;**37**:75-8.
- 91- Slots J, Sugar C, Kamma JJ. Cytomegalovirus periodontal presence is associated with subgingival *Dialister pneumosintes* and alveolar bone loss. *Oral Microbiol. Immunol* 2003;**17**:369-74.
- 92- Papapanou PN, Teanpaisan R, Obiechina NS, Pithpornchaiyakul W, Pongpaisal S, Pisuthanakan S, et al. Periodontal microbiota and clinical periodontal status in a rural sample in southern Thailand. *Eur. J. Oral Sci* 2002;**110**:345-52.
- 93- Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Souto R, Rosalém WJ, Mendes MC, et al. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J. Periodontol* 2002;**73**:360-9.
- 94- Saygun I, Kubar A, Ozdemir A, Yapar M, Slots J. Herpesviral-bacterial interrelationships in aggressive periodontitis. *J. Periodont. Res* 2004;**39**:207-12.
- 95- Saygun I, Fenollar F, Roux V, Stein A, Drancourt M, Raoult D. Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *J. Periodont. Res* 2008;**43**:352-9.
- 96- Michalowicz BS, Ronderos M, Camara-Silva R, Contreras A, Slots J. Human herpesviruses and *Porphyromonas gingivalis* are associated with early-onset periodontitis. *J. Periodontol* 2000;**71**:981-8.
- 97- Mogensen TH, Paludan SR. Molecular pathways in virus induced cytokine production. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 2001;**65**:131-50.

- 98- Wara- Aswapati N, Bosch JA, Auron PE. Activation of interleukin 1b gene transcription by human cytomegalovirus - Molecular mechanisms and relevance to periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol* 2003;**18**:67-71.
- 99- Sugano N, Ikeda K, Oshikawa M, Idesawa M, Tanaka H, Sato S, et al. Relationship between *Porphyromonas gingivalis*, Epstein-Barr virus infection and reactivation in periodontitis. *J. Oral Sci* 2004;**46**:203-6.
- 100- Saygun I, Kubar A, Ozdemir A, Slots J. Periodontitis lesions are source of salivary cytomegalovirus and Epstein-Barr virus. *J. Periodont. Res* 2005;**40**:187-91.
- 101- Sunde PT, Olsen I, Enersen M, Beiske K, Grinde B. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in apical and marginal periodontitis: a role in pathology? *J. Med. Virol* 2008;**80**:1007-11.
- 102- Barbosa FC, Mayer MP, Saba-Chujfi E, Cai S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol. Immunol* 2001;**16**:306-10.
- 103- Girard JR B, Landry RG, Giasson L. Denture stomatitis: etiology and clinical considerations. *J. Can. Dent. Assoc* 1996;**62**:808-12.
- 104- Gosney M, Punekar S, Playfer JR, Bilsborrow PK, Martin MV. The incidence of oral Gram-negative bacteria in patients with Parkinson`s disease. *Eur. J. Int. Méd* 2003;**14**:484-7.
- 105- Paju S, Scannapieco FA. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Dis* 2007;**13**:508-12.
- 106- Souto R, Colombo APV. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Arch. Oral Biol* 2008;**53**:155-60.
- 107- Dahan M, Timmerman MF, Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U. The effect of periodontal treatment on the salivary bacterial load and early plaque formation. *J. Clin. Periodontol* 2004;**31**:972-7.

## **Anexo 1- Guia para autores- Revista Archives of Oral Biology**

### **Aims and Scope**

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality in the oral and craniofacial sciences. The journal is particularly interested in research which advances knowledge in the mechanisms of craniofacial development and disease, including: cell and molecular biology, molecular genetics, immunology, pathogenesis, cellular microbiology, embryology, syndromology, forensic dentistry. The aim is to be inclusive and multidisciplinary and papers are also welcome in the fields of structure and function of craniofacial tissues over the whole range of vertebrates including studies concerned with palaeontology and comparative anatomy. Will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

### **Submissions**

Authors are requested to submit their original manuscript and figures online via Editorial Manager. Submission of a paper implies that it has not been published previously, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that if accepted it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the publisher. Reviewers can download manuscripts and submit their opinions to the editor.

Editors-in-Chief:

Dr G R Holland and Dr GB Proctor

AOB@elsevier.com

Tel: +44 (0)1865 843418

---

Fax: +44 (0)1865 843992

Each manuscript must be accompanied by a statement signed by the corresponding author that the manuscript in its submitted form has been read and approved by all authors. Authors should supply details of related papers submitted or recently published elsewhere. If the manuscript reports experiments or observations using animals or human subjects a statement must be included in the letter of submission indicating that the protocol has been examined and approved by an institutional review board. Authors are invited to suggest upto three referees they consider suitable to review their submission. Full postal and Email addresses should be included. The editors may or may not, at their discretion, utilise these suggestions.

### **Manuscript Preparation**

Papers should be as concise as possible and, in view of the international character of the journal, English usages that may present difficulties to readers whose first language is not English should be avoided. The spellings used can be in English or American, but must be consistent within the manuscript. Authors should express their own findings in the past tense and use the present tense where reference is made to existing knowledge, or where the author is stating what is known or concluded. Original papers should follow the pattern of: Introduction, Materials and Methods, Results or Findings, Discussion.

### **General**

Manuscripts must be word processed (preferably in Word format), double-spaced with wide margins and a font size of 12 or 10 pt. For hardcopy submissions, good quality printouts are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Please check the current style

---

of the journal, particularly the reference style (Vancouver), and avoid excessive layout styling as most formatting codes will be removed or replaced during the processing of your article. In addition, do not use options such as automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering (especially for numbered references). The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain copies of all versions of their manuscript submitted to the journal. Authors are especially requested to be vigilant over the submission of the correct version of the manuscript at the various stages of the editorial process.

### **Text**

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgments, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

### **Title page**

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic or histochemical etc. A "running title" with not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

### **Structured abstracts**

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines

---

published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995;273: 27- 34). In brief, the abstract should be divided into sections including the following: (1) Objective; (2) Design -if clinical to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

### **Received/Accepted Dates**

A received date will be added to all papers when they are received by the Accepting Editor.

An accepted date will also be added when the papers are received at the publishing office.

### **Introduction**

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

### **Materials and Methods**

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly.

Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal experiments were humane; for instance, the mode of anaesthesia and of killing should be specified. In human experimentation, authors should state briefly that the subjects gave informed consent, and preferably that the work was approved by an appropriate ethics committee or review board.

### **Results or Findings**

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing

---

inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

It is usually necessary to analyze numerical results statistically. A statement of the number, their mean value and some appropriate measure of their variability is usually sufficient. The method of analysis followed should be indicated. A statement that the difference between the mean values of two groups of data is statistically significant should give the probability level set as significant by the investigator and indicate the statistical test used. It is not sufficient to quote the use of a statistical package without naming the tests used.

### **Discussion**

This section presents the inferences drawn from the Results: these should be recapitulated only sparingly, sufficient to make the argument clear.

### **References:**

All manuscripts should use the 'Vancouver' style for references, which should be numbered consecutively in the order in which they are first cited in the text and listed at the end of the paper.

For journal references, all authors should be included when there are six or fewer (first six followed by 'et al.' when seven or more), followed by the title of article, name of journal abbreviated according to British Standard 4148: 1975 (or left in full), year, volume, and first and last pages.

For example:

1. Dezan CC, Nicolau J, Souza DN, Walter LRF. Flow rate, amylase activity, and protein and sialic acid concentrations of saliva from children aged 18, 30 and 42 months attending a baby clinic. *Arch Oral Biol* 2002; 47: 423-427.

For book references, the author(s) should be followed by the chapter title (if appropriate),

---

editor(s) (if applicable), book title, place of publication, publisher, year and page numbers.

For example:

2. Gorlin RJ, Pindborg JJ, Cohen MM Jr. Syndromes of the Head and Neck, 2nd Edition. New York: McGraw-Hill, 1976.

Papers in the course of publication should only be entered in the references if the paper has been accepted by a journal, and then given in the standard manner in the text and list of references but with the words "In press" following the name of the journal.

### **Units and Symbols**

In general, *Archives of Oral Biology* will use the recommended SI (Système Internationale) units and symbols. The use of the litre, usually better written in full, in place of SI dm<sup>3</sup> and ml<sup>3</sup> in place of SI cm, will continue to be accepted. For details of the SI symbols, authors are referred to: Symbols, Signs and Abbreviations (1969) by the Royal Society of Metric and Decimal Systems in Council of Biology Editors Style Manual (1978) 4th edn, published by Council of Biology Editors Inc. Units of enzyme activity must be clearly defined, preferably using SI units. Centrifugal force should be stated in multiples of g, rather than as rev/min.

### **Units and abbreviations**

As *Archives of Oral Biology* is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition: ADP, AMP, ATP, DEAE-cellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris.

Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles.

**Bacterial nomenclature.** Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and underlined

---

to denote italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not '*Staph. aureus*'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the *Int J Syst Bacteriol* since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case roman not underlined, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to underline e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case roman e.g. 'meningococcus'.

**Numbers, measurements and statistics.** Numbers one to nine are spelled unless they are measurements (e.g. 5 mL). Numbers greater than nine are spelled out if they begin in a sentence, or when clarity requires it. Numbers above and including 10 000 have a space, not a comma. A decimal point is preceded by a number or cypher e.g. '0.5'. Decimal points in columns should be aligned vertically. Dates are usually provided in full: 14 April 1949.

Measurements may be expressed in SI or non-metric units. Use 10 ml/h rather than -l or per.

**Abbreviations.** Use capitals for: MIC, MBC, WBC, RBC, DNA, RNA, Group A, B etc. for antigenic or other groups, PHLS, CDSC, CDC, WHO, CSF, MSU, EMU, CSU. Use cfu, pfu, mm, m, min, h, in, ft, g, kg, mL, L, im, iv, iu, P(probability). Use sp. and spp. (species, singular and plural). Use Gram's stain and Gram-negative bacillus. Use in-vitro (adjective) but in vitro (adverb), post-mortem (adjective) but post mortem (adverb). Spelling. Use British

---

spellings: Haemophilus, haematology, paediatrics, leucocyte, leukaemia, bacteraemia, sulphonamides, aetiology; but note neutropenia, fetal. Please note the journal uses UK 'z' spelling (e.g., colonizes).

**Drugs.** These should be referred to by their approved and not proprietary names; for guidance, see the British National Formulary.

### **Proprietary Names**

So far as possible, proper names should be used instead of proprietary names. Where it is desirable to indicate a particular brand of preparations, the proprietary name and source should be given in parentheses after the proper name, e.g. Testicular hyaluronidase (Testovase, Bovine Enterprises Ltd, 327 Farm Road, London E23).

### **Illustrations**

In the initial online submission and review stage, authors are required to provide electronic versions of their illustrations. When an article has been accepted, authors must be prepared to provide all illustrations in electronic and camera-ready format, (suitable for reproduction, which may include reduction, without retouching).

The Artwork Quality Control Tool is now available to users of the online submission system.

To help authors submit high-quality artwork early in the process, this tool checks the submitted artwork and other file types against the artwork requirements outlined in the Artwork Instructions to Authors on [www.elsevier.com/arkworkinstructions](http://www.elsevier.com/arkworkinstructions). The Artwork Quality Control Tool automatically checks all artwork files when they are first uploaded.

Each figure/file is checked only once, so further along in the process only new uploaded files will be checked.

**General:** Information relating to the preferred formats for Artwork and Illustrations may be found at [www.elsevier.com/authors](http://www.elsevier.com/authors). Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are

---

referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All hard copy illustrations should be clearly marked on the back with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

**Line drawings:** All lettering, graph lines and points on graphs should be sufficiently large and bold to permit reproduction when the diagram has been reduced to a size suitable for inclusion in the journal. Dye-line prints or photocopies are not suitable for reproduction. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

**Photographs:** Original photographs must be supplied as they are to be reproduced (e.g. black and white or colour). If necessary, a scale should be marked on the photograph. Please note that photocopies of photographs are not acceptable.

**Colour:** Certain illustrations will be approved for publication in colour but only if, in the opinion of the Editors, the figures convey information not apparent in monochrome. Please note that if figures are supplied in colour, they will automatically be available online in colour at no extra charge, even if the print version is monochrome.

**Tables:** Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate sheet. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript, (e.g. in graphs).

### **Acceptance**

After acceptance, authors may be requested to provide Elsevier with hard-copy and electronic versions of their manuscript and their figures. The electronic copy, on floppy disk, CD-ROM or ZIP, should match the hardcopy exactly, therefore always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Full details of electronic submission and formats can be obtained from [⇒www.elsevier.com/authors](http://www.elsevier.com/authors).

---

Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Full details of electronic submission and formats can be obtained from [www.elsevier.com/authors](http://www.elsevier.com/authors).

### **Hardcopy submissions**

Authors should submit an electronic copy of their paper with the final version of the manuscript. The electronic copy should match the hardcopy exactly. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Full details of electronic submission and formats can be obtained from Author Services at Elsevier.

### **Proofs**

Proofs will be sent to the author (first-named author if no corresponding author is identified on multiauthored papers) by PDF wherever possible and should be returned within 48 hours of receipt, preferably by e-mail. Corrections should be restricted to typesetting errors; any other amendments made may be charged to the author. Any queries should be answered in full. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are returned to us in one all-inclusive e-mail or fax. Subsequent additional corrections will not be accepted. Should you choose to mail your corrections, please return them to: Log-in Department, Elsevier, Stover Court, Bampfylde Street, Exeter, Devon EX1 2AH, UK.

### **Offprints**

Offprints and copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted. Orders placed late (after publication) for reprints will incur a 50% surcharge.

---

## Anexo 2- Comissão de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba



### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA –CEP-

OF. 126/2007  
CEP  
SFCD/bri

Araçatuba, 01 de outubro de 2007.

Referência Processo FOA 2007-01369

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável do relator que analisou o projeto "CONDIÇÕES DA SAÚDE BUCAL EM PACIENTES COM SÍNDROME DE DAWN: AVALIAÇÃO DOS FATORES SÓCIO-ECONÔMICOS, CULTURAIS, DIETÉTICOS E MICROBIOLÓGICOS" expede o seguinte parecer:

**Aprovado:**

Informamos a Vossa Senhoria que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, deverá ser enviado relatório parcial em 27/09/2008 e o relatório final em 27/09/2009.

*h. o. j.*  
Prof. Dr. Stefan Fátima de Curyalho Dekon  
Coordenador do CEP

Ilmo. Senhor  
Dr. ELERSON GAETTI JARDIM JÚNIOR  
Araçatuba-SP-

Ciente.De acordo.  
*19/10/08*  
*[Signature]*  
Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior

## Anexo 3- Termo de Consentimento Esclarecido



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

(Resolução nº 01 de 13/06/98 – CNS)

### TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

#### I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome do Paciente:			
Documento de Identidade nº	Sexo:	Data de Nascimento:	
Endereço:		Cidade:	U.F.
Telefone:		CEP:	

1. Responsável Legal:			
Documento de Identidade nº	Sexo:	Data de Nascimento:	
Endereço:		Cidade:	U.F.
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):			

#### II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. Título do protocolo de pesquisa: Condições da Saúde Bucal em Pacientes com Síndrome de Down: Avaliação dos Fatores Sócio-Econômicos, Culturais, Dietéticos e Microbiológicos		
2. Pesquisador responsável: Elerson Gaetti Jardim Junior		
Cargo/função: Professor Adjunto	Inscr.Cons.Regional:	Unidade ou Departamento do Solicitante: Laboratório de Microbiologia e Imunobiologia da FOAraçatuba- Unesp
3. Avaliação do risco da pesquisa: (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo).		
<input checked="" type="checkbox"/> SEM RISCO <input type="checkbox"/> RISCO MÍNIMO <input type="checkbox"/> RISCO MÉDIO <input type="checkbox"/> RISCO MAIOR		

#### 4. Justificativa e os objetivos da pesquisa (explicitar):

A Síndrome de Down é considerada a mais freqüente das síndromes com marcada influência da hereditariedade, podendo ser definida como uma desordem genética caracterizada pela presença de um cromossomo 21 adicional, acarretando variável grau de retardo no desenvolvimento motor, físico e mental, sendo geralmente reconhecida por uma constelação de anormalidades associadas (PUESCHEL, et al., 1995; COGULU et al., 2006), cuja ocorrência é encontrada em 1: 800 nascimentos, mostrando-se mais comum entre filhos de parturientes com 40 anos de idade ou mais (THOMPSON, M. W., 1986).

As principais manifestações bucais faciais dessa síndrome são macroglossia, língua fissurada, alterações no desenvolvimento maxilo-mandibular, agenesia dental, má-oclusão, hipersalivação, baixa prevalência de cárie, maior predisposição à doença periodontal agressiva e patologias infecciosas (AMANO et al., 2000; AMANO et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2005; DAVILA et al., 2006; ELWARD e FRASER, 2006), cálculo, microdontia (KROLL, et al., 2004). Embora a literatura evidencie um menor risco à cárie e maior risco ao desenvolvimento de periodontopatias. Entretanto, inexistem informações adequadas que expliquem esses fenômenos (AMANO et al., 2001; BRADLEY e MCALISTER, 2004; DAVILA et al., 2006).

Como a maioria dos processos patológicos que acomete a cavidade bucal é de natureza infecciosa, com o envolvimento predominante de microrganismos anaeróbios obrigatórios, a composição da microbiota bucal e a forma com que a mesma se relaciona com seu hospedeiro é de fundamental importância para o estabelecimento dessas condições clínicas (KILLIAN et al., 2006). Nesse sentido, estudos com adolescentes e crianças portadoras de síndrome de Down evidenciaram relação entre a colonização da cavidade bucal desses pacientes por *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* e o desenvolvimento de perdas significativas de inserção conjuntiva (MORINUSHI et al., 1997; MORINUSHI et al., 2006). Contudo, as populações de diferentes áreas geográficas apresentam peculiaridades na composição de sua microbiota bucal, refletindo características genéticas, ambientais, culturais e sócio-econômicas, de forma que a extrapolação do perfil de colonização da cavidade bucal entre diferentes populações constitui procedimento inadequado (HAFFAJEE et al., 2004; KILLIAN et al., 2006). Em teoria, as limitações dos pacientes portadores de síndrome de Down, bem como as particularidades imunológicas, anatômicas e fisiológicas (LEE et al., 2004) poderiam alterar a ocorrência e distribuição dos principais microrganismos bucais envolvidos em processos infecciosos como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens*, *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola*, *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* (YANG et al., 2005; FENG & WEINBERG, 2006; GAETTI-JARDIM Jr. et al., 2006).

Nesse aspecto, a microbiota bucal de pacientes com Síndrome de Down, em nosso país, necessita de caracterização, particularmente quando se verifica que os pacientes portadores de Síndrome de Down atendidos pelo CAO-UNESP apresentam uma ocorrência muito pequena de periodontopatias (596 pacientes, dos quais 5% apresentaram gengivite) e uma freqüência significativamente maior de cárie. Contudo, em nosso país, são escassos os estudos objetivando a caracterização da microbiota bucal de pacientes com necessidades especiais, particularmente quando condições locais parecem modificar a ocorrência esperada de patologias, como as periodontopatias.

Contudo, o isolamento e identificação de microrganismos que necessitam de maiores cuidados no cultivo, como a maioria dos microrganismos anaeróbios obrigatórios, parte numericamente mais significativa da microbiota associada às infecções da região de cabeça e pescoço, não são realizados com frequência em nosso país (GAETTI-JARDIM JR., 2001; PAULA et al., 2003). Recentemente, os métodos de diagnóstico molecular, como os baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), se converteram em uma importante ferramenta na identificação das espécies microbianas bucais, principalmente para microrganismos de cultivo exigente (ÁVILA-CAMPOS et al., 2006; JERVOE-STORM et al., 2007), além de colaborar na compreensão das inter-relações entre essa microbiota e seu hospedeiro.

#### 1.1 2. Objetivos

Em função do papel desempenhado pela microbiota bucal e por diferentes fatores predisponentes no estabelecimento e progressão da cárie dentária e da doença periodontal este estudo tem como objetivos:

- 1) avaliar as condições de saúde bucal de pacientes portadores de Síndrome de Down;
- 2) caracterizar quantitativa e qualitativamente, por meio de cultura e PCR, a microbiota do biofilme subgingival, supragingival, dorso da língua, bem como a presente na saliva desses pacientes;
- 3) verificar as condições sócio-econômicas, culturais, comportamentais desses pacientes;
- 4) correlacionar os diferentes fatores analisados e as condições de saúde bucal, procurando estabelecer uma dos diferentes fatores e o risco de desenvolvimento das patologias estudadas;
- 5) verificar a influência do atendimento dos pacientes no CAO-E-UNESP sobre as condições de saúde bucal e perfil da microbiota bucal dos pacientes, procurando aprimorar os protocolos de atendimento da população alvo como resultado da análise de risco realizada.

5. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: (explicitar)

6. Desconfortos e riscos esperados: (explicitar)

7. Benefícios que poderão ser obtidos: (explicitar)

8. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: (explicitar)

9. Duração da pesquisa:

Padronização das condições experimentais e atualização do cadastro de pacientes	Agosto 2007 / Setembro 2007
---	-----------------------------

Coleta de espécimes clínicos	Setembro 2007 / Julho 2008
Confecção do relatório parcial	
Isolamento microbiano e identificação dos isolados	Outubro 2007 / Agosto 2008
Realização dos procedimentos de amplificação do DNA	Outubro 2007 / Setembro 2008
Análise estatística dos dados e discussão	Janeiro 2009/ Fevereiro 2009
Confecção dos artigos de publicação e relatório final	Janeiro 2009 / Fevereiro 2009
10. Aprovação do Protocolo de pesquisa pelo comitê de ética para análise de projetos de pesquisa em 01 / 06 /2007	

### III - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

1. Recebi esclarecimentos sobre a garantia de resposta a qualquer pergunta, a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento do indivíduo.
2. Recebi esclarecimentos sobre a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação de meu tratamento.
3. Recebi esclarecimento sobre compromisso de que minha identificação se manterá confidencial tanto quanto a informação relacionada com a minha privacidade.
4. Recebi esclarecimento sobre a disposição e o compromisso de receber informações obtidas durante o estudo, quando solicitada, ainda que possa afetar minha vontade em continuar participando da pesquisa.
5. Recebi esclarecimento sobre a disponibilidade de assistência no caso de complicações e danos decorrentes da pesquisa.
Observações complementares.

#### 1.2 IV – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido (a) pelo pesquisador, conforme registro nos itens 1 a 6 do inciso III, consinto em participar, na qualidade de paciente, do Projeto de Pesquisa referido no inciso II.

\_\_\_\_\_ Local, / / .

Assinatura

\_\_\_\_\_ Testemunha

Nome .....:

Endereço.:

Telefone .:

R.G. ....:

\_\_\_\_\_ Testemunha

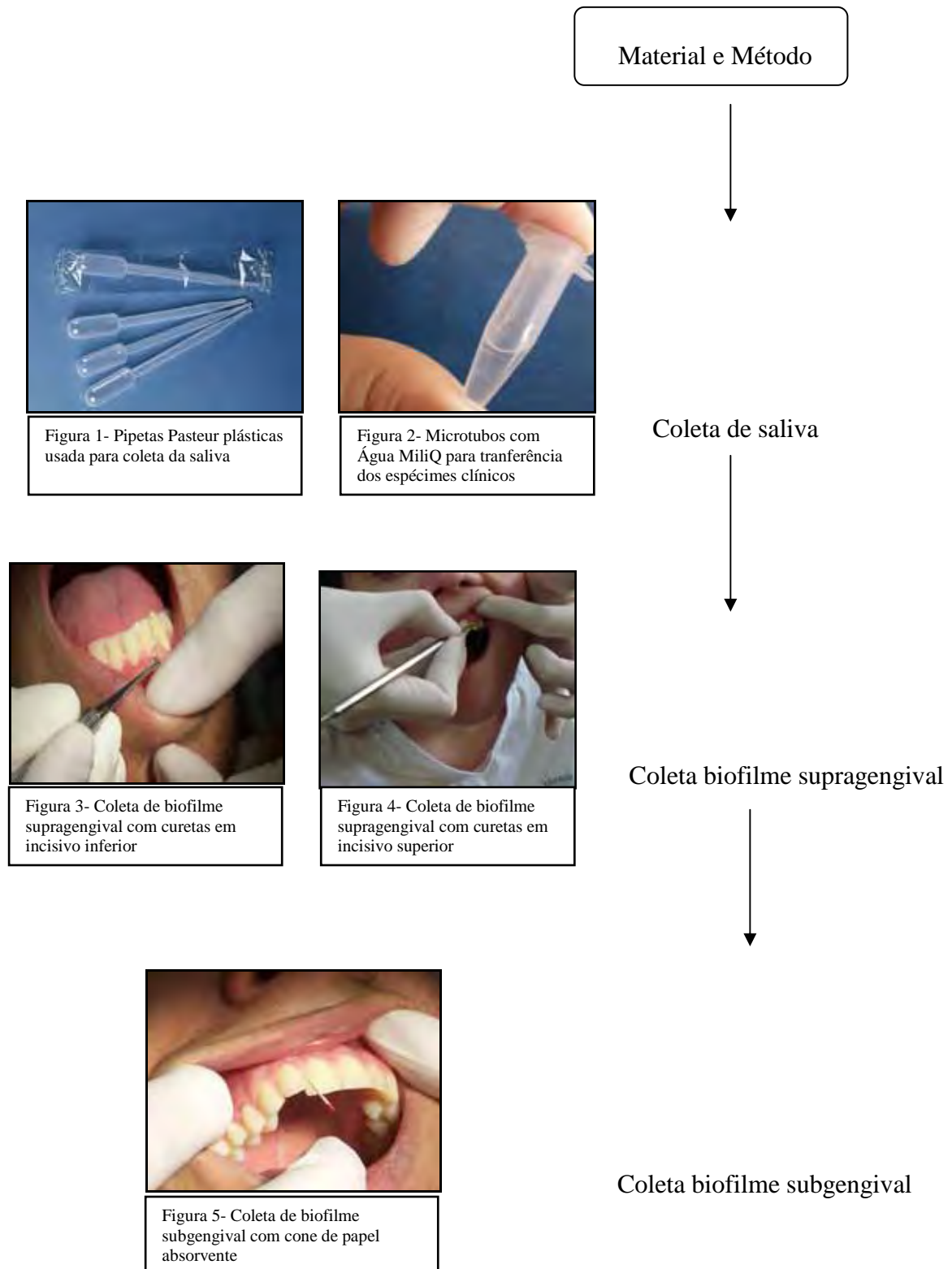
Nome .....:

Endereço.:

Telefone .:

R.G. ....:

## Anexo 4 - Resumo da Coleta dos espécimes Clínicos



## Anexo 5- Resumo da Amplificação do DNA por PCR convencional e “nested PCR

