



Universidade Norte do Paraná

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM ODONTOLOGIA



LONDRINA

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FLÁVIO JOSÉ SAMBATTI PIERALISI

**DETECÇÃO E SIMILARIDADE GENÉTICA DE
STREPTOCOCCUS MUTANS PELA REACÇÃO EM CADEIA
DA POLIMERASE (PCR) NOS PARES MÃES-FILHOS DOS
CENTROS MUNICIPAIS DE EDUCAÇÃO INFANTIL DE
LONDRINA- PR**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Odontologia da Universidade Norte do Paraná, para obter o Título de Mestre, pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração:
Dentística com Ênfase à Área Preventiva

Orientadora: Profª Drª Regina Célia Poli-Frederico

LONDRINA

2006

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P672d Pieralisi, Flávio José Sambatti.

Detecção e similaridade genética de *Streptococcus mutans* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) nos pares mães-filhos dos centros municipais de educação infantil de Londrina-PR / Flávio José Sambatti Pieralisi. - Londrina : 2006.

xii; 66p. : il.

Dissertação (Mestrado). Odontologia. Universidade Norte do Paraná. Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Célia Poli-Frederico

1- Odontologia - dissertação de mestrado – UNOPAR. 2- Dentística preventiva. 3- *Streptococcus mutans*. 4- Reação em cadeia da polimerase PCR /AP-PCR. 5- Cárie dental. I- Poli-Frederico, Regina Célia, orient. II- Universidade Norte do Paraná.

CDU 616.314-089.27/.28

FLÁVIO JOSÉ SAMBATTI PIERALISI

**DETECÇÃO E SIMILARIDADE GENÉTICA DE
STREPTOCOCCUS MUTANS PELA REACÇÃO EM CADEIA
DA POLIMERASE (PCR) NOS PARES MÃES-FILHOS DOS
CENTROS MUNICIPAIS DE EDUCAÇÃO INFANTIL DE
LONDRINA- PR**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Odontologia da Universidade Norte do Paraná, para obter o Título de Mestre, pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia.

BANCA EXAMINADORA

1) Profª Drª Ilce Mara de Syllos Cólus

Julgamento _____ Assinatura _____

2) Profª Drª Flaviana Bombarda de Andrada Ferreira

Julgamento _____ Assinatura _____

3) Profª Drª Regina Célia Poli- Frederico

Julgamento _____ Assinatura _____

Londrina, 30 de março de 2006.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família.

Ao meu amado filho, Flávio Henrique, seu sorriso sincero é recompensa por ultrapassar todos os obstáculos, ouvir seu “te amo papi” me faz buscar o que há de melhor em mim.

À minha mãe, Maria Aparecida, Prof^a. Sambatti, por me proporcionar a possibilidade de estudar para me tornar uma pessoa e profissional cada vez melhor. Por toda a minha vida ter me ensinado a importância do aprendizado, e por sempre ter me ajudado para que este fosse sempre prazeroso e possível.

Ao meu pai José Pieralisi, exemplo de força, simplicidade, determinação e dedicação. Espero um dia ser metade do homem que ele é.

À minha namorada Francine, um anjo em forma de mulher, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo amor, carinho e dedicação demonstrados dia-a-dia, por simplesmente me fazer feliz.

Ao meu irmão Dr. Christiano, sua busca incessante por novos conhecimentos é inspiradora.

À minha cunhada Silvia.

Aos meus sobrinhos Natália e João Pedro.

Com vocês a meu lado me sinto completo.

AGRADECIMENTOS

Profª Drª Regina Célia Poli-Frederico, meus sinceros agradecimentos, pelo apoio incondicional e horas de dedicação, pela confiança depositada, por acreditar em meu potencial e não me fazer desistir, pela orientação segura e precisa em uma área que fugia a meu domínio, por fazer o que parecia impossível se tornar realidade.

Prof. Dr. Luiz Reynaldo de Figueiredo Walter, Coordenador do Curso de Mestrado em Odontologia da UNOPAR, meu odontopediatra, meu professor dos tempos de faculdade, meu sempre mestre, meu amigo, agradeço os incentivos constantes.

Prof. Bruno Tedesco Rosa, grande amigo, que ajuda a traçar minha carreira profissional desde a faculdade, poder trabalhar com você é um privilégio.

Profª Drª Sandra Mara Maciel, que participou da fase da coleta de dados e de presença marcante na fase da estatística, sua ajuda foi decisiva.

Profª. Adriana Pigozzo Manso, colega do Curso de Especialização da AONP, pelo companheirismo em suprir minha ausência durante a fase final deste trabalho.

Aos alunos do Curso de Especialização da AONP, pela confiança e compreensão.

Prof. Drª Ilce Mara de Syllos Cólus, por ceder seu laboratório da UEL na fase final deste trabalho e abrilhantar a banca examinadora.

À Helen Kuasne, da Biomedicina da UEL, pela grande ajuda com a eletroforese na fase final da pesquisa.

Às alunas da iniciação científica, da Odontologia: Geórgia Cristina Cecconello, Samia Nabhan e Augusta Piovezzan.

Prof. Marco Antônio Laffranchi, Chanceler da UNOPAR, pelo incentivo inicial e empreendedorismo.

Prof^a. Elizabeth Bueno Laffranchi, Reitora da UNOPAR, exemplo de competência profissional.

Sra. Vera Martins, Secretária do Mestrado da UNOPAR, uma profissional dedicada, obrigado pela atenção dispensada e pela conversa amiga.

Às bibliotecárias, pela presteza e rapidez ao atender minhas solicitações.

Aos Professores do Mestrado, pela amizade, compreensão e transmissão dos conhecimentos.

Aos meus colegas de turma:

Adriana Tozzo

Fabiana Jandre Melo

Hebert Samuel Carafa Fabre

Hermes Martelli Júnior

Liliam Lucia Carrara Paes Mello

Patrícia da Silva Lopes Navarro

Patrícia Lanza

Tereza Furquim

Valter Flávio Scalco

Viviane Garcia Segura

Walter Busch Pereira

Desta turma heterogênea surgiu uma amizade que levarei por toda a vida.

À Karine e Tatiane, funcionárias da Clínica Santé Sampiera, que souberam administrar com presteza os momentos de minha ausência.

Ao meu parceiro na Clínica Santé Sampiera, Dr. Tiago Sfredo, pela amizade de muitos anos e pela ajuda nos atendimentos enquanto eu estava me dedicando a este trabalho.

Às mães que autorizaram que seus filhos participassem e que também colaboraram com o desenvolvimento da pesquisa.

A Deus, por nunca me fazer desistir de meus sonhos e objetivos.

PIERALISI, Flávio José Sambatti. **Detecção e similaridade genética de *Streptococcus mutans* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) nos pares mães-filhos dos centros municipais de educação infantil de Londrina-Pr.** 2006. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Curso de Odontologia da UNOPAR, Londrina.

RESUMO

A doença cárie é tida como infecciosa e transmissível e o *Streptococcus mutans* (Sm) é considerado seu principal agente etiológico. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é apontada como sendo uma forma rápida e precisa para sua identificação. Este estudo objetivou-se a detectar a presença de *Streptococcus mutans* e a similaridade genética deste microrganismo em crianças de 4 e 5 anos matriculadas nos centros municipais de educação infantil (CEMEIs) de Londrina-PR e suas respectivas mães (N=68). Assim como avaliar a experiência de cárie e o padrão de higiene bucal além de verificar a existência de associação entre as variáveis biológicas, sociais e demográficas nestes pares. As condições bucais foram avaliadas pelo levantamento da prevalência de cárie, seguindo critérios da Organização Mundial de Saúde, pelo índice de higiene oral simplificado, pela utilização do índice de placa O'Leary; e os testes de detecção e similaridade foram feitos através de PCR específica para o gene *spaP* e AP-PCR respectivamente. Baixo índice de ceo-d foi observado na maioria das crianças - 2,09(3,21); o índice de placa O'Leary médio apresentado pelas crianças foi alto - 48,26 (18,69); as mães apresentaram altos índices de CPO-D e higiene oral precária; em 50% das crianças e 23,2% das mães foi detectada a presença de *Streptococcus mutans*; houve associação positiva estatisticamente significativa entre as variáveis de estudo das mães: severidade de cárie, índice de higiene, idade materna, renda familiar e escolaridade materna; houve associação negativa estatisticamente significativa entre as variáveis de estudo das crianças: índice de placa, severidade de cárie, renda familiar e escolaridade materna; verificou-se uma tendência à transmissão horizontal de genótipos de Sm entre as crianças (60%). Esses achados podem vir a facilitar o desenvolvimento de estratégias clínicas para a prevenção ou diminuição da infecção de crianças por esse microrganismo, reduzindo, então, a prevalência de cárie dentária.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans* – PCR / AP-PCR – Cárie dentária

PIERALISI, Flávio José Sambatti. **Identification and similarity of *Streptococcus mutans* using the polimerase chain reaction (PCR) from mother and infant attending the Municipal Centers Of Infantile Education of Londrina –Pr. 2006.** Dissertation (Masters degree) - UNOPAR's Dentistry Course, Londrina.

ABSTRACT

Dental caries is an infectious and transmissible disease and the *Streptococcus mutans* (Sm) is considered to be its major aetiologic agent. The polymerase chain reaction (PCR) is pointed as being a fast and sensitive way for the detection of this bacteria. The main aim of this cross-sectional study was to detect the presence of *Streptococcus mutans* and the genetic similarity of this microorganism in children of 4 and 5 years old who were regularly attending the municipal centers of infantile education (CEMEIs) of Londrina-PR and its respective mothers (N=68). As well as evaluating the experience of caries and the pattern of oral hygiene, besides verifying the existence of association among the biological, social and demographic variable in these pairs. The oral conditions had been evaluated by the survey of the prevalence of caries, following criteria of the World Health Organization guidelines and through the plaque index, by the O'Leary plaque index; the test of detection and similarity had been made through PCR and AP-PCR. Low index of dmft was observed in the majority of the children - 2,09(3,21); the average O'Leary index presented by the children was high - 48,26 (18,69); the mothers had presented high severity and precarious oral hygiene; in 50% of children and 23.2% of the mothers was detected the presence of *Streptococcus mutans*; there was positive statically significantly association among the variable of study of the mothers: severity of caries, index of hygiene, age, familiar income and years of study; there was negative statically significantly association among the variable of study of the children: index of plaque, severity of caries, familiar income and age of mothers; a trend to the horizontal transmission of genotypes of Sm between the children was verified (60%). These findings probably will facilitate the development of clinical strategies for the prevention or reduction of the infection of children from this microorganism, reducing, then the prevalence of dental caries.

Key-words: *Streptococcus mutans* – PCR / AP-PCR – Dental Caries

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - Perfis de DNA gerados por PCR dos pares 9 a 16. Linha 1, 50pb DNA ladder. 43
- FIGURA 2 - Perfis de DNA gerados por AP-PCR dos isolados do par 2. Linha 1, 50pb DNA ladder; linhas 2 a 11, criança 2; linhas 12 a 15, mãe 2. 55
- FIGURA 3 - Dendrograma baseado nos perfis de AP-PCR. O coeficiente de Jaccard foi gerado à partir de análise UPGMA baseado na comparação da matriz de similaridade das linhagens isoladas de *S. mutans*. A seta indica a transmissão de um genótipo da mãe para a criança. 56
- FIGURA 4 - Dendrograma baseado nos perfis de AP-PCR. O coeficiente de Jaccard foi gerado à partir de análise UPGMA baseado na comparação da matriz de similaridade das linhagens isoladas de *S. mutans*. A seta indica a transmissão de um genótipo entre as crianças de um mesmo CEMEI. 57
- FIGURA 5 - Dendrograma baseado nos perfis de AP-PCR. O coeficiente de Jaccard foi gerado à partir de análise UPGMA baseado na comparação da matriz de similaridade das linhagens isoladas de . As setas indicam a presença de 5 genótipos distintos de *S. mutans* para a criança do par 16 e pode se verificar que somente um genótipo foi compartilhado pela mãe. 58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Re-categorização do índice CPO-D	46
TABELA 2 -	Re-categorização do índice ceo-d	46
TABELA 3 -	Re-categorização do índice de placa O'Leary	47
TABELA 4 -	Características sócio-demográficas das crianças de 4 e 5 anos de idade matriculadas nos CEMEIs de Londrina-PR (N=56)	48
TABELA 5 -	Distribuição de <i>Streptococcus mutans</i> nas crianças de 4 e 5 anos matriculadas dos CEMEIs de Londrina-PR e suas respectivas mães (N=56)	49
TABELA 6 -	Detecção de <i>S. mutans</i> nas crianças de 4 e 5 anos dos CEMEIs de Londrina-Pr segundo o gênero (N=56)	49
TABELA 7 -	Detecção de <i>S. mutans</i> nos pares mães-crianças dos CEMEIs de Londrina-Pr (N=56)	50
TABELA 8 -	Distribuição das crianças de 4 e 5 anos de idade matriculadas nos CEMEIs de Londrina-PR segundo a experiência de cárie (N=56)	50
TABELA 9 -	Correlação entre características sociais, demográficas e biológicas nas mães das crianças de 4 a 5 anos matriculadas nos CEMEIs de Londrina-PR (N=56)	51
TABELA 10 -	Correlação entre características sociais, demográficas e biológicas das crianças de 4 e 5 anos matriculadas nos CEMEIs de Londrina-PR (N=56)	52
TABELA 11 -	Experiência de cárie e renda familiar das crianças de 4 e 5 anos matriculadas nos CEMEIs de Londrina-Pr (N=56)	52
TABELA 12 -	Detecção de <i>S. mutans</i> e severidade da cárie dentária nas mães das crianças de 4 e 5 anos matriculadas nos CEMEIs de Londrina-PR (N=54)	53

TABELA 13- Detecção de *S. mutans* e severidade de cárie dentária nas crianças de 4 e 5 anos matriculadas nas CEMEIs de 53 Londrina-PR (N=56)

TABELA 14 Detecção de *S.mutans* das mães e severidade de cárie nas crianças de 4 e 5 anos matriculadas nos CEMEIs de 54 Londrina-PR (N=56)

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase utilizando primers ao acaso

ceo-d – Dentes decíduos cariados, com extração indicada e obturados

CD- Cirurgião Dentista

CEMEIS – Centros municipais de educação infantil

CPO-D – Dentes permanentes cariados, perdidos e obturados

DNA – Ácido desoxirribonucléico

IHOS – Índice de higiene oral simplificado

M – Molar

OMS – Organização Mundial de Saúde

p- Nível de significância

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PR – Paraná (estado brasileiro)

r- Coeficiente de correlação

S. mutans – *Streptococcus mutans*

Sm - *Streptococcus mutans*

SPSS – *Statistical Package for Social Science*

UNOPAR – Universidade Norte do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo Geral.....	38
3.2 Objetivos Específicos.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Avaliação das condições bucais dos pares mães-filhos.....	39
4.2 Caracterização sócio-demográfica dos pares mães-filhos.....	40
4.3 Detecção de estreptococos do grupo mutans pela reação em cadeia da polimerase específicas nos pares mães-filhos	40
4.3.1 Extração de DNA da placa dental.....	41
4.3.2 Amplificação pela PCR de genes específicos de <i>S. mutans</i>	42
4.3.3 Eletroforese em gel de agarose	42
4.4 Avaliação da similariedade genética de <i>S. mutans</i> nos pares mães-filhos	43
4.4.1 Coleta das colônias isoladas	43
4.4.2 Extração simplificada de DNA cromossômico	44
4.4.3 Identificação pela PCR de <i>S. mutans</i>	44
4.4.4 Genotipagem por AP-PCR	45
4.5 Procedimentos estatísticos	45
5 RESULTADOS	48
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXOS.....	69

1 INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença infecciosa-transmissível onde o *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) apresenta-se como o maior agente etiológico (FLORIO *et al*, 2004; SPOLIDORIO *et al*, 2003). A aquisição precoce de uma microbiota cariogênica pode ocorrer durante a formação do ecossistema bucal, em tenra idade, concomitantemente ao irrompimento da dentição decídua. Esta colonização precoce está relacionada à alta atividade de cárie durante a infância (ALALUUSUA *et al*, 1996). Estudos baseados em marcadores de DNA indicam a transmissão vertical da bactéria da mãe para o filho como sendo a principal rota da aquisição precoce (LINDQUIST e EMILSON, 2003).

É bem aceito que as crianças assemelham-se a seus pais, o que pode ser detectado tanto através de traços físicos, como comportamentais. Muitas características, em adição aos genes, são compartilhadas pela família, como as práticas de higiene e a valorização da saúde bucal.

Os hábitos alimentares da família também interferem nos hábitos da criança (BLINKORN, 1981). A existência de correlação entre o alto consumo de açúcar das crianças e de suas mães vem sendo observada, o que sugere que a preferência por doces é, em parte, um hábito aprendido (HONKALA *et al*, 1984), ou uma característica herdada, assim como existe a hereditariedade relacionada ao paladar amargo determinado pelo gene dominante (T) (ANLIKER *et al*, 1991).

Contudo, não se pode esquecer que o consumo de alimentos adoçados sofre influência de uma série de fatores biológicos, psicológicos, culturais, sociais e ambientais (DESOR *et al.*, 1979).

A existência de um padrão familiar similar na experiência de cárie tem sido apontada pela literatura (BLINKHORN, 1981; TUUTTI *et al.*, 1989; PEREZ *et al.*, 1996; DUTRA *et al.*, 1997; KOHLER; ANDREEN, 1999; ZANATA *et al.*, 2003). Diferentes hipóteses têm sido levantadas, buscando-se as prováveis explicações para o mesmo. Razões genéticas e ambientais, envolvendo tanto fatores microbiológicos como alimentares têm sido as mais consideradas (AALTONEN, 1991) e continuam sendo motivo de debate.

Streptococcus mutans são freqüentemente isolados da placa dental e lesões cariosas. Essa bactéria é identificada por métodos convencionais assim como testes bioquímicos e sorológicos seguidos pelo isolamento das colônias em meio ágar mitis-salivarius. Recentemente, a reação em cadeia da polimerase (PCR) espécie-específica foi reportada como sendo uma forma rápida para identificação de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. O desenvolvimento desta estratégia é relevante para a prevenção de cáries dentárias, pois permite a identificação das fontes de transmissão de *Streptococcus mutans* (OKADA *et al.*, 2002).

A colonização pelo *S.mutans* em idade precoce da criança está relacionada às cáries severas durante a infância. A este fator adicionam-se outros como a freqüência de transferência celular bacteriana, fatores do hospedeiro que

influenciam o ataque bacteriano ou seu crescimento, sobrevivência bacteriana durante a transferência e a composição da dieta do hospedeiro (KLEIN *et al*, 2004).

Existem relatos em literatura (MATTOS-GRANNER *et al*, 2003; TANNER *et al*, 2004) que indicam a transmissão horizontal de *S. mutans* como sendo o principal vetor pelo qual esta bactéria se perpetua entre os humanos. Além de que crianças em diferentes idades abrigam grande diversidade genotípica (LI e CAUFIELD, 1995) e esta diversidade pode acarretar em graus diversos de severidade de cárie dentária.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Grande parte da população mundial é afetada pela cárie dentária. Apesar dos múltiplos fatores associados à ocorrência da cárie dentária nos distintos sub-grupos populacionais, há evidências de que seja uma doença passível de controle (FDI,1982).

Focando-se estritamente aspectos biológicos, seu desenvolvimento se processa da seguinte forma: alguns tipos de bactérias colonizam os dentes e ao agruparem-se constituem a chamada placa dental. Estas ao utilizarem mono e dissacarídeos (por exemplo, glicose, frutose, sacarose) em sua via glicolítica para produção de energia, induzem a formação de ácidos como subprodutos desse metabolismo, alguns dos quais podem ser nocivos à estrutura dos dentes, desencadeando o processo de desmineralização da mesma (GIBBONS, 1964).

O grau de desmineralização provocado é dependente do aumento ou decréscimo do pH absoluto e do tempo de permanência do pH entre 5,2 e 5,5, nível que pode promover a dissolução do esmalte (TINANOFF, PALMER, 2000). Depende, ainda, dos seguintes fatores: tipo e freqüência da dieta, grau de susceptibilidade do hospedeiro, bem como da microbiota estabelecida no indivíduo.

Streptococcus mutans é um bom indicador da cárie; no geral, quanto mais *S.mutans*, mais cárie. Entretanto, a sua presença em números elevados apenas indica que o ambiente bucal está apropriado para o início ou progresso da cárie dentária. Muitas outras bactérias como *Lactobacilos*, *Cândida albicans* e

Streptococcus sobrinus capazes de produzir ácidos a partir de açúcares e proliferarem em condições ácidas, também estão envolvidas no processo da cárie (BOWDEN, 1997).

Cáries que acometem precocemente as crianças podem promover a destruição da dentição primária dos bebês e das crianças pré-escolares (KOHLENER *et al.*, 1988). A cárie é considerada um problema de saúde pública e está concentrada principalmente na população de baixa renda, que dificilmente tem acesso ao tratamento odontológico e desconhece as medidas básicas de prevenção.

É de grande relevância a atuação dos pais em relação à higiene bucal da criança, já nos seus primeiros dias de vida, pois um precursor no desenvolvimento da cárie dentária é o acúmulo da placa dental bacteriana. Tem sido demonstrado que crianças que apresentam placa dental visível aos 12 meses têm maior probabilidade de desenvolver cárie dentária aos 3 anos de idade, quando comparadas àquelas livres da placa (SCHRODER, GRANATH, 1983; WENDT *et al.*, 1994).

A AQUISIÇÃO PRECOCE DE *S. mutans*

A boca de um bebê sem dentes irrompidos contém somente a superfície da mucosa exposta ao fluido salivar. O *S. mutans* poderia persistir neste ambiente pela formação de colônias aderentes à superfície da mucosa ou por estar somente presente na saliva se duplicando. A microbiota oral apresenta de 2 a 4 divisões por dia e o ato de engolir se dá a cada poucos minutos, portanto, é razoável assumir que

a bactéria não pode se manter na saliva apenas por sua proliferação, ao invés disso, poderia atacar a superfície oral. Estudos anteriores (revisado por GIBBONS e VAN HOUTE, 1975) demonstraram que o *S. mutans* apresenta uma capacidade insignificante para se aderir à superfície epitelial. Entretanto, estudos mais recentes (TANNER *et al*, 2002) demonstraram que o *S. mutans* deve colonizar a boca de bebês sem o início da dentição decídua e os sulcos da língua parecem ser um nicho ecológico importante para este fato.

A AQUISIÇÃO PRECOCE DE *S. mutans* E A CÁRIE NA PRIMEIRA INFÂNCIA.

A colonização precoce de *S. mutans* é o maior risco para a cárie assim como o desenvolvimento de cáries futuras. Alaluusua e Renkonen (1982) avaliaram a colonização longitudinal e cárie dentária em crianças de 2-4 anos de idade; as crianças que abrigaram *S. mutans* em suas placas dentárias na idade de 2 anos apresentaram mais cáries aos 4 anos de idade. Observações similares foram realizadas por Kohler *et al* (1988) onde relataram que 89% das crianças com colonização pelo *S. mutans* aos 2 anos de idade tinham lesões aos 4 anos de idade. Em uma outra avaliação longitudinal, Grindejord *et al* (1995) analisaram 786 crianças de até 1 ano de idade para os fatores de risco à cárie (infecção pelo *S. mutans*, exposição ao flúor, dieta, higiene oral) e re-examinaram aos 3,5 anos de idade para a presença de cárie dentária. A presença de *S. mutans* foi o prognóstico mais efetivo de cárie aos 3,5 anos de idade. Estas observações, junto com outros resultados publicados (FUJIWARA *et al*, 1991; ROETERS *et al*, 1995) - ilustram que

infecção precoce com *S. mutans* é um fator de risco significativo para o desenvolvimento futuro de cáries dentárias.

Segundo Martins *et al.* (1998), nos primeiros anos de vida, os bebês podem ser acometidos pela cárie simples onde as lesões geralmente são diagnosticadas nas proximais dos dentes anteriores e nas superfícies oclusais, atingindo menos de seis dentes, e pela cárie rampante ou cárie de mamadeira, primeiro sinal de cárie aguda em seres humanos. A cárie de mamadeira afeta principalmente a superfície vestibular dos incisivos superiores, em geral próximo à margem gengival, podendo estender-se para as faces proximais e superfície palatina. Se o processo não for interrompido o padrão de ataque se dá em função da cronologia de erupção, com a característica clínica marcante de preservação dos incisivos inferiores.

Em 1996, Mattos-Graner *et al.* avaliaram 322 crianças de baixo nível sócio-econômico, usuárias de creches municipais da cidade de Piracicaba, determinando a prevalência de lesões incipientes (desmineralizações) e cavidades (índice ceos). Na faixa etária de 6 a 12 meses 4,9% das crianças apresentavam desmineralizações. Nas idades entre 13 e 18 meses, 8% apresentavam desmineralizações e 3% cavidades. A prevalência aumentou para 10% (desmineralizações) e 13,6% (cavidades) com idades entre 19 e 24 meses.

Relatos epidemiológicos de outros países mostram grande variação na prevalência da cárie na primeira infância. Atuam nesse caso como moduladores, fatores sócio-econômicos e culturais. Porém, uma observação comum aos estudos é o aumento significativo da prevalência com a idade, assim como o impacto da

implantação precoce de *S. mutans* na experiência futura de cárie e a presença de grupos de polarização, altamente afetados pela doença.

Segundo Milnes (1996), investigações conduzidas na Europa reportam prevalência de cárie na primeira infância entre 1 e 12 %. Na Austrália encontram-se valores próximos a 5%. No continente asiático o autor reporta prevalências de 20% para a China e 48% para Indonésia. Na Tanzânia observou-se uma larga variação entre prevalência de diferentes regiões do país (1,8% a 22%). Nos Estados Unidos e Canadá, diferentemente do observado na maioria dos países, há uma vasta literatura sobre a prevalência de cárie na primeira infância. A prevalência é baixa para populações urbanas em geral, variando de 1 a 5 %. Porém, em áreas pouco privilegiadas do ponto de vista sócio-econômico atinge valores próximos a 12%. Entre grupos étnicos específicos como americanos nativos (indígenas e esquimós) a prevalência é altíssima, atingindo 70% das crianças, e entre imigrantes hispânicos ou latinos são reportadas prevalências entre 23 e 30%.

Grindefjord *et al.* (1993) na Suécia, avaliaram 1095 crianças de 1 ano de idade quanto à presença de *S. mutans* e encontraram uma prevalência de 6%, estando este fato correlacionado positivamente com a frequência de ingestão de sacarose. Com a idade de 30 meses, 76% das crianças foram avaliadas quanto à prevalência de cárie, levando-se em consideração fatores sociais, étnicos, microbiológicos e de higiene oral. Cerca de 8,4% das crianças suecas e 14,3% das crianças de origem imigrante foram diagnosticadas como cárie-positivas, e 28% estavam colonizadas pelo *S. mutans*. Observaram correlação positiva entre a presença de cavidades e a colonização por *S. mutans*, a presença de inflamação

gingival (8%) e a origem imigrante. Os dentes mais afetados foram os incisivos superiores (72% das lesões), e 40% das crianças apresentavam mais de 3 lesões. A origem imigrante foi considerada um preditor significativo do risco de cárie. Neste grupo houve uma superior prevalência de microrganismos cariogênicos, assim como um consumo de sacarose significativamente maior e um inferior padrão de higiene oral. As crianças de origem não sueca pertenciam, em sua maioria, às classes sociais menos favorecidas, nas quais as prevalências observadas foram significativamente superiores às de classes mais altas (9,7% x 3,6%, respectivamente).

Dando seqüência a este estudo longitudinal, em 1995, Grindefjord *et al.* avaliaram a prevalência de cárie das crianças, então com três anos e meio correlacionando este fato com o valor de predição de variáveis pré-determinadas com a idade de 1 ano. Concluíram que a prevalência de cárie aumentou significativamente da idade de 2,5 para 3,5 anos (11,7% x 37%). As crianças que apresentavam-se cárie positivas em idade precoce exibiram um padrão de progressão da lesão mais rápido e um incremento significativamente maior do que crianças livres de cárie em avaliações anteriores. Os fatores com valor de predição foram: origem imigrante e nível educacional da mãe, freqüência de ingestão de sacarose e colonização precoce por Sm. Quando todas as variáveis estavam presentes a probabilidade de desenvolver lesões era de 87%. O risco aumentou quase 32 vezes quando comparado ao risco de crianças onde nenhum dos fatores estava presente com a idade de 1 ano.

Alaluusua e Renkonen (1983) na Finlândia, através de monitoramento microbiológico de 39 crianças observaram diferenças significativas na experiência de cárie de crianças conforme a precocidade da detecção de *S. mutans*. Treze por cento das crianças mostraram-se *S. mutans* positivas antes de 2 anos de idade. Aos 4 anos, 33% das crianças eram *S. mutans* positivas. As crianças que adquiriram o microrganismo precocemente mostraram-se uma experiência de cárie mais severa com a idade de 4 anos (ceos = 10,6) do que crianças que adquiriram *S. mutans* entre 2 e 4 anos (ceos = 3,4) ou aquelas *S. mutans* negativas (ceos = 0,3).

Alaluusua e Malmivirta (1994) estudaram 92 crianças de 19 meses de idade buscando identificar fatores associados à futura experiência de cárie. Foram avaliadas as seguintes variáveis: o acúmulo de placa nas superfícies vestibulares dos incisivos superiores, o uso de mamadeira durante o sono, a prevalência de cárie e a contagem de *S. mutans* da mãe. Foi feita a correlação entre o risco estimado com a idade de 19 meses e a ocorrência de cárie com a idade de 36 meses. Aos 3 anos 14% das crianças apresentaram cárie. A ocorrência de lesões mostrou-se fortemente associada ao acúmulo de placa que apresentou um valor prognóstico de 91%. As demais variáveis alcançaram uma precisão próxima a 70%. A contagem de *S. mutans* da saliva materna foi correlacionada com o número e extensão das lesões de cárie das crianças, porém não com a prevalência da doença.

Mattos-Graner *et al.* em 1998, avaliaram a relação entre a prevalência de cárie em crianças brasileiras de 1 a 2,5 anos e algumas variáveis clínicas (presença de placa visível nos incisivos superiores), microbiológicas (contagem de *S. mutans* na saliva), e comportamentais (dieta). Das 142 crianças examinadas, 64% estavam

livres de cárie, 17% apresentavam apenas desmineralizações e 19% apresentavam cavidades. Foram diagnosticadas 98 lesões iniciais e 90 cavidades. Os dentes mais afetados foram os molares inferiores (48% das lesões). Tanto as lesões iniciais como as manifestas foram diagnosticadas principalmente nas superfícies oclusais (55% e 65%, respectivamente), seguidas das superfícies livres (36% e 15%, respectivamente) e proximais (9% e 21%, respectivamente). A presença de placa visível foi detectada em 44,4% das crianças e as contagens de *S. mutans* foram positivas para 80,3% da amostra. Ambas variáveis foram correlacionadas com uma maior prevalência de cárie e foram considerados bons preditores do risco de cárie para a população estudada.

Berkowitz (1996) relata que em crianças afetadas pela cárie de mamadeira 50% dos microorganismos cultiváveis da placa dentária são *S. mutans*. Em contraste, os *S. mutans* usualmente compõem menos de 1% da flora da placa de crianças com baixa atividade de cárie. Caracteriza a cárie da primeira infância como “*mutans* dependente” e especula que somente crianças infectadas por estes microorganismos em tenra idade são consideradas de risco.

TRANSMISSIBILIDADE

O maior reservatório a partir do qual os bebês adquirem *S. mutans* é suas mães. A evidência deste conceito provém de muitos estudos onde as linhagens isoladas de *S. mutans* das mães e dos seus bebês exibiram perfis para bacteriocinas idênticos ou similares (DAVEY, 1984; BERKOWITZ et al, 1985) e padrões de DNA cromossômico e plasmidial idênticos. O sucesso da colonização de

bebês pela transmissão materna de *S. mutans* é relacionada a vários fatores, incluindo a magnitude do inóculo, a frequência da inoculação de pequena-dose e a dose mínima de infecção. Berkowitz *et al.* (1991) relataram que a frequência da infecção dos bebês foi aproximadamente 9 vezes maior quando os níveis salivares maternos do microrganismo excederam a 10^5 unidades formadoras de colônias (CFU)/ mL do que quando reservatórios salivares maternos foram menores ou igual a 10^3 CFU/mL (58% vs. 6%).

Em 1946, Klein com o propósito de examinar a relação entre o CPOD (número de dentes cariados, perdidos e obturados) de genitores e seus filhos, estudou 1.150 famílias de ascendência nipônica. Encontrou uma consistente correlação entre a experiência de cárie de genitores e filhos, observando “uma significativa tendência dos filhos refletirem na sua própria experiência de cárie, o padrão já demonstrado por seus pais (pais e mães)”. Atribuiu os achados a “uma susceptibilidade à doença envolvendo fortes vetores familiares e talvez relacionada ao gênero”, pois, constatou que variações no CPOD dos pais tinham apenas uma suave correlação positiva com a experiência de cárie dos filhos, enquanto as variações do CPOD materno estavam fortemente relacionadas com a experiência de cárie dos herdeiros, principalmente com as meninas.

Os estudos com animais “germ-free” e os revolucionários trabalhos de KEYES (1960) provaram a hipótese de ser a cárie uma doença fundamentalmente microbiológica, sugerindo ainda uma via de transmissão bacteriana de modelo “matrilinear” (da mãe para o filho).

Em 1975, Berkowitz e Jordan preocuparam-se em definir a fonte de infecção destes microorganismos na espécie humana baseando-se na rota de transmissão materna reportada para roedores por Keyes. Observaram uma forte homogeneidade de perfis (sorotipagem e padrões de bacteriocinas) entre *Sm* isolados de pares mãe-filho, indicando ser a mãe a principal fonte de infecção primária.

Caufield; Cutter; Dasanayake (1993) monitoraram, longitudinalmente, os níveis salivares de microorganismos (*S. mutans*, *Lactobacilos*) de 46 pares mãe-filho do nascimento até a idade de 36 meses. As mães selecionadas apresentavam contagem inicial de *Sm* $> 2,5 \times 10^4$ UFC/mL de saliva e um CPOS médio >30 . As contagens bacteriológicas foram feitas a cada 3 meses e as mães foram submetidas a um programa preventivo. Os níveis de *S. mutans* e *Lactobacilos* das mães de crianças infectadas ou não por *S. mutans* não diferiram estatisticamente. Observaram que a aquisição inicial de *S. mutans* ocorreu em 38 crianças com idades entre 19 e 31 meses, média de 26 meses, estabelecendo um período favorável à implantação deste microorganismo denominado “janela da infectividade”. Neste período ocorre um aumento significativo no número de superfícies dentárias virgens, especialmente as fissuras oclusais e as concavidades proximais dos molares decíduos.

Relatos recentes em literatura indicam que a transmissão vertical não é o vetor principal pelo qual *S. mutans* é perpetuado nas populações humanas, mas sim a transmissão horizontal (ZHOU *et al* 2005; TEDJOSASONGKO e KOZAI, 2002).

Mattos-Graner *et al.* (1996) isolaram *S. mutans* de crianças atendidas em creches (12-30 meses de idade) e genotiparam os isolados através da técnica PCR/RFLP. Observaram que muitas crianças apresentaram genótipos idênticos de *S. mutans*, indicando que a transmissão horizontal deve ser um outro vetor para a aquisição desse microrganismo.

Tanner *et al.* (2002) avaliaram a similaridade entre a microbiota oral de crianças e de suas atendentes nas creches. O perfil microbiano das crianças foi associado fortemente com a microbiota de suas atendentes na creche.

O aspecto comportamental não pode ser esquecido, ao contrário, é um dos fatores mais complexos de se trabalhar dentro da etiologia da cárie, porém, de suma importância na sua prevenção e este foi o objetivo de pesquisa de muitos autores.

Perez *et al.* (1996), utilizando os índices CPOS modificado, placa visível, e sangramento gengival, observaram similaridades no padrão de saúde bucal de 30 pares mãe-filho. Alta atividade de cárie foi detectada em 53% das mães e 46% dos filhos. Alto índice de placa em 63% das mães e 66% dos filhos e um elevado índice de sangramento gengival foi observado em 40% das mães e 50% dos filhos. A coincidência da atividade de cárie entre mãe e filho foi observada em 73% dos pares estudados. Constataram ainda que a grande maioria das mães (26) não usava fio dental. Vinte e três mães escovavam o dente apenas uma vez ao dia e demoravam menos de um minuto para realização da escovação.

Edwards e Rowntree (1969) avaliaram o nível de conhecimento sobre saúde bucal de 300 primigestas da região de Sheffield, Reino Unido. Observaram diferença significativa entre o nível de conhecimento sobre saúde e higiene bucal e a prática da última, pois, 60% apresentavam hábitos de higiene oral insatisfatórios, embora o nível de conhecimento sobre a prática adequada superasse sua aplicação. A falta de preocupação com a dentição decídua e a aceitação apática da perda dos dentes foram pontos de interesse.

Blinkhorn (1981) investigou a transmissão, da mãe para a criança, de comportamentos de rotina relacionados ao consumo de açúcar e a hábitos de higiene oral. Segundo o autor, os comportamentos aprendidos durante a primeira infância (socialização primária) permanecem profundamente enraizados e são resistentes a mudanças. Intervenções de educação em saúde durante esta fase têm a preocupação primeira de formar hábitos ao invés de tentar mudar rotinas já estabelecidas. Então, os grupos alvo para a educação em saúde são as recém-mães e as gestantes. Denomina esta abordagem como socialização antecipatória, pois as crianças moldam seus comportamentos espelhando-se na família, particularmente na mãe, e adquirem hábitos alimentares e de higiene durante a socialização primária, agindo sem questionar suas ações por aceitarem o padrão instituído como natural.

Sarnat; Kagan; Raviv (1984) investigaram o efeito da atitude materna com relação aos cuidados com a própria dentição na prevalência de cárie delas e de seus filhos. Segundo os autores, quanto mais positiva for a atitude da mãe em relação às suas necessidades odontológicas, menor sua prevalência de cárie,

menor a incidência de cárie em seus filhos e melhor a qualidade de higiene oral da criança.

Segundo Tsamtsouris; Stack; Padamsee (1986), a saúde bucal da criança reflete os padrões de atitudes e comportamentos de seus pais, portanto, estes deveriam ser educados antes de terem filhos. Isto destaca a importância de ações educativas durante o período pré-natal atuando beneficemente tanto sobre fatores materno-fetais como posteriormente sobre a criança. Durante a gestação a motivação dos pais é grande e grupos de aconselhamento pré-natais devem ser aproveitados, pois grupos pós-natais são pouco freqüentados. Os autores trabalharam com um grupo de 179 futuros pais de diversos níveis sócio-econômicos. A atuação foi limitada à aplicação de uma palestra de trinta minutos abordando o papel da alimentação, medicamentos e flúor durante o período pré-natal, a prevenção da cárie na primeira infância e orientação de como proceder a correta higiene bucal da gestante e do bebê.

Após 8, 12 e 24 meses Shein; Tsamtsouris; Rovero (1991) avaliaram o impacto da atuação pré-natal questionando os pais sobre os tópicos abordados na palestra de Tsamtsouris; Stack; Padamsee (1986). Concluíram que, embora a aquiescência (nível de conhecimento) sobre medidas preventivas tenha sido maior para os pais do grupo experimental, uma única abordagem é ineficaz em garantir maior preocupação com a saúde bucal da criança. O reforço constante das orientações é necessário para que mudanças de hábito ocorram. Sugerem o aprimoramento das técnicas de transmissão de conhecimento e a participação

efetiva dos meios de comunicação para aumentar a assimilação e motivação dos pais.

Na Irlanda do Norte, McCabe e Kinirons (1995) constataram que na faixa etária de 0 a 2 anos apenas 35% dos pais haviam levado seus filhos ao dentista, sendo a principal razão alegada a ausência de dor ou de cavidades, o que mostra que, mesmo em países desenvolvidos, uma filosofia preventiva para a primeira infância precisa ser encorajada. Os autores também observaram que a prevalência de cárie estava significativamente associada ao nível educacional da mãe, sendo a prevalência da doença quatro vezes superior para as crianças cujas mães tinham apenas educação básica quando comparadas às crianças cujas mães haviam completado o 3º grau (46,8% x 10,6%, respectivamente). Segundo os autores o padrão de atendimento odontológico da mãe é refletido nos filhos. Quanto mais freqüentes e regulares são as visitas da mãe ao dentista, maior a probabilidade dela levar o filho menor de 3 anos para uma consulta.

Além das evidentes necessidades de tratamento enfocadas pela literatura em populações obstétricas de diversos países, constata-se que as gestantes têm carência de informações adequadas sobre sua própria saúde oral e de seus futuros bebês. Esse fato é freqüente e correlato com a situação sócio-econômica, sendo mais preocupante em populações de baixa renda e pouco grau de instrução. Este grupo tem seu acesso ao cirurgião-dentista dificultado por barreiras financeiras e culturais, raramente recebendo educação odontológica e apresentando um perfil resistente à mudança de atitude/comportamento. Esse quadro coloca os bebês

numa situação altamente favorável ao desenvolvimento da cárie precoce da infância ou cárie da primeira infância.

IDENTIFICAÇÃO DE *S.MUTANS*

A literatura sustenta que o estabelecimento precoce de *Streptococcus mutans* na cavidade oral de crianças aumenta o risco destas desenvolverem lesões cárias. Estudos abordando o momento mais propício para a infecção, e fontes e rotas de transmissão têm sido realizados. Resultados sugerem que a principal fonte de infecção seja a saliva materna. Métodos usados para confirmar esta hipótese têm se desenvolvido consideravelmente nos últimos anos. Esses dados forneceram informação adequada para o estabelecimento de estratégias preventivas visando evitar ou retardar primo-infecção por *S. mutans*. (MATTOS-GRANNER *et al*, 1996; OKADA *et al*, 2002; LI e CAUFIELD, 1995).

A certeza da participação de microrganismos específicos no desenvolvimento deste processo infeccioso foi estabelecida por vários estudos subseqüentes aos de KEYES, quando um grupo de bactérias, fenotipicamente, similares denominadas “*Streptococcus mutans*”, tornaram-se associadas com o início da cárie e com a atividade e prevalência desta doença.

Li e Caufield (1998) determinaram a similaridade de genótipos de *S. mutans* entre mães e seus bebês através da análise de ácido desoxirribonucleico das bactérias. Genótipos idênticos estavam presentes em 71% dos 34 pares mãe-filho. A homogeneidade de genótipos foi significativamente mais freqüente para as meninas

do que para os meninos (88% x 53%). Em nenhum momento observou-se homologia entre os pais e as crianças ou entre maridos e esposas, indicando que este microrganismo dificilmente é transmitido fora da janela da infectividade que ocorre por volta dos 2 anos de idade.

O grupo *mutans* de estreptococos orais consiste de sete espécies: *Streptococcus cricetus*, *S. rattus*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. downei*, *S. macacae* e *S. ferus*. As espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* são os mais freqüentemente isolados na placa dental humana e estão fortemente associados com a cárie dentária em humanos (LOESCHE, 1986). Tem sido relatado em estudos epidemiológicos que a freqüência de *S. mutans* é muito maior que a de *S. sobrinus* isolados na cavidade oral. A diferenciação primária dessas espécies cariogênicas é baseada geralmente na morfologia da colônia crescida em meio agar mitis-salivarius (MS) ou MS-bacitracina (MSB). As colônias isoladas são, então, identificadas por testes bioquímicos e imunológicos. Entretanto, estes procedimentos são às vezes imprecisos, além de dispender grande tempo e trabalho. Novas ferramentas tais como sondas de DNA e primers para PCR devem ser utilizadas para sobrepor estas limitações (SPOLIDORIO *et al*, 2003; OKADA *et al*, 2005).

É amplamente aceito que metodologias incluindo a PCR fornecem um método mais sensível para a detecção de possíveis espécies de bactérias patogênicas, quando comparados com técnicas de culturas convencionais. Por outro lado, é capaz de detectar números muito baixos de bactérias com um limite de detecção de tão pouco quanto 25-100 células e ao mesmo tempo é rápido e relativamente simples de ser realizado (OKADA *et al*, 2002).

A implantação de *S. mutans* é promovida pela presença de adesinas que interagem com receptores salivares. Durante a aderência inicial do *S. mutans* é necessário que ele produza uma adesina fibrilar de 190 KD, conhecida como Ag I/II codificada pelo gene *spaP* (ONO *et al*,1994).

Baseados no fato de que *S.mutans* adere ao esmalte do dente através do antígeno I/II e que isto constitui um marcador genético para linhagens potencialmente cariogênicas, Ono *et al* (1994) implementaram um sistema para amplificar este antígeno, utilizando a PCR em isolados microbiológicos da placa dentária.

Utilizando um procedimento similar Igarashi *et al.*, 1996 usaram a seqüência do gene que codifica a dextranase (dex A) e obtiveram um segmento amplificado, por meio da PCR, detectando a linhagem cariogênica de *S. mutans*.

Barone, Macedo e Marin (2005) fizeram a identificação, pelo método da PCR, dos tipos de colônias de *S.mutans* em crianças com síndrome de Down e sugeriram que em crianças portadoras desta síndrome a colonização de *S.mutans* muda mais de uma vez.

GENOTIPAGEM DE *S. mutans* ATRAVÉS DA AP-PCR (“arbitrary primed PCR” – PCR utilizando primers arbitrários)

A técnica para detectar polimorfismos de DNA amplificados ao acaso (AP-PCR) é um método baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR), em que se emprega um primer curto (decâmero = 10 bases) para amplificar porções anônimas de DNA, já que não se busca nenhum fragmento de DNA específico (Williams et al., 1990; Welsh & McClelland, 1990). Os fragmentos de DNA assim gerados são separados e detectados através de eletroforese de DNA em gel de agarose ou poliacrilamida.

A natureza dos marcadores de AP-PCR é binária, somente pode-se avaliar a presença ou ausência de uma banda. Os critérios para selecionar bandas são: reprodutibilidade, espessura e tamanho da banda.

Marcadores AP-PCR em geral apresentam um bom conteúdo informativo, isto é, possuem uma boa capacidade multiplex (amostram o genoma em vários locos ao mesmo tempo), identificam um bom número de locos polimórficos por reação, embora discriminem um baixo número de alelos por loco (dois alelos, amplificado e não-amplificado). Alia-se a isto o fato de ser uma técnica altamente acessível, por ser rápida, relativamente de baixo custo e pouco intensiva em mão-de-obra. Esta alta acessibilidade confere à técnica uma boa aceitação para análises relacionadas à: (a) diferenciação de linhagens, (b) estimativa de variabilidade em Bancos de Germoplasma, (b) estudo de estrutura genética de populações, (d) estimativa de parâmetros genéticos, (e) estudos de duplicação de acessos em Bancos de

Germoplasma, (f) análise de paternidade, etc. As vantagens desta técnica incluem: grande número de fragmentos obtidos, técnica sensível, os primers arbitrários são obtidos facilmente e não requerem a informação inicial do tipo genético ou genômico. Mostram desvantagens como marcadores dominantes isto é, o fenótipo eletroforético de um indivíduo heterozigoto para um determinado loco não é geralmente distinguido de um indivíduo homozigoto para o alelo amplificado. Estas qualidades, naturalmente, podem limitar a utilização de AP-PCRs para certos tipos de análise, falta de conhecimento prévio da identidade dos produtos amplificados e problemas de co-migração.

Em função do exposto já são inúmeros os trabalhos que analisam e estimam diversidade genética de diferentes animais, vegetais e microrganismos utilizando a técnica.

Saarela et al. (1996) propuseram o emprego da técnica de AP-PCR na genotipagem de diferentes espécies e sorotipos de estreptococos orais. Os resultados obtidos indicaram que AP-PCR apresenta boa habilidade para diferenciar clones de estreptococos do grupo mutans e que pode ser utilizada em estudos epidemiológicos.

Li & Caufield em 1998 desenvolveram e avaliaram o método AP-PCR para a caracterização genotípica de *Streptococcus mutans*. Concluíram que esta técnica é capaz de distinguir linhagens desta bactéria entre indivíduos não relacionados. E, ainda, pode discernir genótipos de *S. mutans* em pares mães/filhos.

A diversidade clonal e padrões de colonização de *S. mutans* em crianças de 3 a 7 anos de idade foram objetivos do estudo conduzido por Gronröos & Alaluusua (2000). As crianças apresentaram de 1 a 4 genótipos diferentes de *S. mutans* em sítios diferentes, sugerindo que os clones colonizam seletivamente sítios específicos.

Li, Caufield, Emanuelsson, Thornqvist (2001) compararam as metodologias AP-PCR e o perfil de DNA cromossômico em diferenciar *S. mutans* de *S. sobrinus* e sugeriram que ambas podem e devem ser alternativas eficientes ao invés de sorotipagem ou ribotipagem para estreptococos do grupo *mutans*.

Ersin et al. (2004) utilizaram o método da PCR para investigar a transmissão de *S. mutans* em um grupo de famílias na Turquia. Verificaram que havia similaridade genética entre todos os pais, mães e respectivas crianças, bem como entre maridos e esposas. Concluíram que as mães ou os pais poderiam ser fontes de transmissão para seus filhos.

Napimoga et al. (2004) utilizaram a técnica da AP-PCR em *S. mutans* isolados da placa dental, saliva e língua. Encontraram diferença significativa no número de genótipos entre os indivíduos com cárie e livres de cárie.

Com o objetivo de acompanhar o perfil da colonização de *S. mutans* e *S. sobrinus* na cavidade oral de crianças, Klein et al (2004) fizeram um estudo longitudinal que incluiu a verificação da transmissão de mãe para filho, diversidade genótipa e estabilidade das colônias, através da PCR.

Assim, estudos que venham a ampliar os conhecimentos sobre a existência de diferentes genótipos de *Streptococcus mutans* na cavidade oral, suas relações entre a virulência e a atividade de cárie, com o emprego de técnicas moleculares mais adequadas, permitirão uma maior compreensão do desenvolvimento desta doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

- Detectar pela reação em cadeia da polimerase e avaliar a similaridade genética de *Streptococcus mutans* nos pares mães-filhos dos centros municipais de educação infantil de Londrina – PR – Brasil.

3.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a experiência de cárie e o padrão de higiene bucal de crianças de 4 e 5 anos de idade, matriculadas em centros municipais de educação infantil da cidade de Londrina-Pr;
- Avaliar a experiência de cárie e o padrão de higiene bucal materno;
- Detectar a presença de linhagem potencialmente cariogênica de estreptococos do grupo *mutans* nos pares de mães e filhos pela reação em cadeia da polimerase específica (PCR);
- Avaliar a similaridade genética de estreptococos do grupo *mutans* nos pares de mães e filhos pela reação em cadeia da polimerase utilizando-se primers arbitrários (AP-PCR);
- Analisar a existência de associação entre as variáveis biológicas, sócio-demográficas estudadas e a ocorrência de cárie dentária nos pares mães-filhos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Estudo transversal, tendo como universo mães e seus filhos de 4 e 5 anos de idade, matriculados nos Centros Municipais de Educação Infantil (CEMEIs) da cidade de Londrina-Pr.

Após pedido (Anexo 1) e autorização oficial das direções das creches, termos de consentimento livre e esclarecido foram entregues às mães destas crianças. Constituíram a população de estudo, 68 pares mães-filhos cujos termos de participação foram assinados pelas mães (Anexo 2), sendo que 56 pares foram avaliados quanto à presença de *S. mutans* e 28 pares quanto à similaridade genética.

Previamente à fase de coleta este projeto foi aprovado pelo comitê de ética da UNOPAR (Anexo 3).

4.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES BUCAIS DOS PARES MÃES-FILHOS

A avaliação das condições de saúde bucal foi feita nos pares mães-filhos através da experiência e severidade da doença cárie e do padrão de higiene oral verificados através de índices internacionais. Para tanto houve calibração dos avaliadores anteriormente à realização desta etapa.

O exame das condições bucais foi baseado na experiência de cárie dentária, seguindo os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde (World Health Organization 1997), através dos índices CPO-D para as mães e ceo-d para as crianças.

O padrão de higiene bucal foi avaliado através do Índice de Higiene Oral Simplificado (GREENE; VERMILLION), para as mães e o índice O'Leary para as crianças.

Os exames foram conduzidos sob luz natural, em condições ambientes, com o auxílio de espelho clínico e sonda para remoção de detritos.

4.2 CARACTERIZAÇÃO SÓCIO-DEMOGRÁFICA DOS PARES MÃES-FILHOS

Entrevistas com as mães foram conduzidas por entrevistadores devidamente calibrados. Foram utilizados formulários semi-estruturados, contendo informações sobre a caracterização sócio-demográfica nos pares mães-filhos.

4.3 DETECÇÃO DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS (*STREPTOCOCCUS MUTANS*) PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE –PCR- ESPECÍFICA , NOS PARES MÃES-FILHOS.

Para a detecção pela PCR de *Streptococcus mutans* amostras da placa dental de 56 pares de mães-filhos provenientes dos CEMEIs de Londrina foram

colhidas utilizando sondas esterilizadas, transferidas para tubos eppendorfs contendo meio BHI (Infusão de cérebro e coração) para posterior extração de DNA.

4.3.1 Extração de DNA bacteriano da placa dental

Para a extração de DNA bacteriano a partir da placa dental utilizou-se o procedimento descrito a seguir:

- Homogeneizar as amostras coletadas em meio BHI e incubar por 18 h à 37°C.
- Centrifugar a cultura de bactérias a 3000 rpm por 10 min.
- Descartar o sobrenadante e lavar o “pellet” de células duas vezes em 500 ul de tampão de diluição TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM) em pH 8,0.
- Ressuspender o “pellet” em 250 ul de TE.
- Adicionar 20ul de lisozima (2mg/ml) e incubar por 60 min. à 37°C e depois por mais 20 min. a 60°C.
- Colocar 10ul de proteinase K (4 ug/ml) e incubar a 37°C. por 60 min.
- Adicionar 10ul de SDS 10% juntamente com 7,3 ul de cloreto de sódio (4M) e incubar por 10 min. à 60°C.
- Adicionar 1000ul de etanol absoluto gelado para o DNA ser precipitado.
- Após a secagem do DNA colocar 50ul de tampão de diluição (TE) pH 8,0.

4.3.2 Amplificação pela PCR de genes específicos de *S. mutans*

A amplificação realizada foi do fragmento de 192 pb do gene *spaP* pela PCR descrita por Ono *et al* (1994).

As amplificações do gene *spaP* foram realizadas em um termociclador (Thermal Cycler / TC020A – Labnet international), em uma mistura de reação (25 ul) contendo: 200 uM ddTTP, 2,5 mM MgCl₂, 2U Taq polimerase, 25 pmol de cada primer e 20-50 ng de amostra de DNA.

Para o gene *spaP* foram utilizados os primers obtidos do Gene Bank (número de acesso x17390) com a seguinte sequência:

- Upstream 5'AAC GAC CGC TCT TCA GCA GAT ACC-3'
- Downstream 5'AGA AAG AAC ATC TCT AAT TTC TTG-3'

A mistura de reação foi desnaturada a 95°C, por 3 min.; seguida de uma série de 30 ciclos de amplificações: desnaturação a 95°C., por 1 min.; pareamento a 57°C, por 30 seg.; e extensão a 72°C, por 1 min. O ciclo final foi compreendido por 94°C, por 1 min.; 55°C, por 1 min.; e 72°C, por 5 min.

4.3.3 Eletroforese em gel de agarose

Após a amplificação, 15 ul do produto de PCR foram analisados por eletroforese, em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídeo corrido a 80 Volts. Os fragmentos de DNA recém sintetizados foram visualizados sobre luz

ultravioleta a 302 nm. O tamanho do produto da PCR foi estimado a partir da migração eletroforética do produto relativo ao marcador de peso molecular Ladder 50-pb (Invitrogen). A presença de bandas de tamanhos de 192pb (*spaP*) indicou a presença de *S. mutans* (Figura 1).

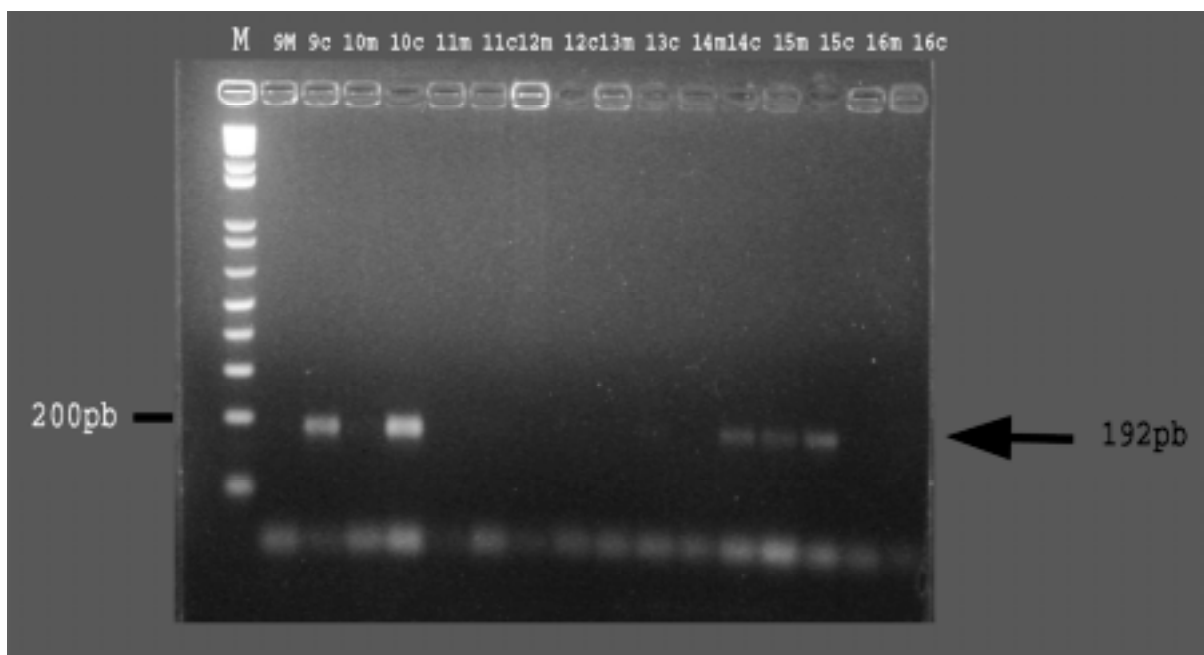


Figura 1. Perfis de DNA gerados por PCR dos pares 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16. Linha 1, Marcador de peso molecular 50pb DNA ladder.

4.4 AVALIAÇÃO DA SIMILARIDADE GENÉTICA DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS (*STREPTOCOCCUS MUTANS*) NOS PARES MÃES-FILHOS

4.4.1 Coleta das colônias isoladas.

Com auxílio de microscópio estereoscópico (Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, SP), foram retiradas colônias suspeitas de pertencerem aos estreptococos do grupo mutans (*S. mutans*) desenvolvidas na superfície do ágar mitis salivarius bacitracina de cada par mãe-filho (Segura, VG; Ferreira, FBA; 2006). Cada colônia foi

transferida para um tubo eppendorf contendo meio BHI e incubadas por 24h em jarras de anaerobiose. Uma alíquota da cultura de bactérias foi submetida à extração de DNA.

4.4.2 Extração simplificada de DNA cromossômico.

As células bacterianas crescidas em meio BHI foram lavadas e fervidas por 10 min. em tampão TE (tris-HCl 10mM; EDTA 1 mM pH 8.0). O sobrenadante foi utilizado para a identificação por PCR e genotipagem pela AP- PCR.

4.4.3 Identificação pela PCR de *S. mutans*.

As amostras de *S. mutans* isolados foram identificados pela PCR com primers que flanqueiam os genes GTFB-F e GTFB-R (517 pb) descritos (Oho *et al.*, 2000).

As amplificações dos genes GTFB-F e GTFB-R foram realizadas em um termociclador (Thermal Cycler / TC020A – Labnet international), em uma mistura de reação (10 ul) contendo: 10 mM Tris-HCl buffer, 200 uM ddTTP, 1,5 mM MgCl₂, 1U Taq polimerase, 1mM de cada primer e 20-50 ng de amostra de DNA.

Os primers foram obtidos do Gene Bank (número de acesso M17361) com as seguinte sequências:

- GTFB-F 5'-ACTACACTTTCGGGTGGCTTGG
- GTFB-R 5'-CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC

As condições da PCR foram: desnaturação a 95°C., por 30s.; pareamento a 59°C, por 30 seg.; e extensão a 72°C, por 1 min. Esta amplificação foi repetida por 30 ciclos.

4.4.4 Genotipagem por AP-PCR.

A AP-PCR (reação em cadeia da polimerase utilizando primers arbitrários) foi realizada com o primer OPA-02 descrito por Li & Caufield (1998).

As reações de amplificação foram conduzidas em uma mistura (50ul) contendo: 100mM Tris-HCl, 500mM KCl, 200mM dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 2,5U Taq polimerase.

As condições da PCR compreenderam 45 ciclos de amplificações: 30s a 94°C, 30s a 36°C, 1min. a 72°C.

4.5 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS.

Os dados obtidos em cada avaliação:

- índice de higiene oral (pares mães-filhos);
- experiência e severidade de cárie dentária;
- variáveis sócio-demográficas;
- detecção de estreptococos *mutans* nos pares mães-filhos;
- similaridade genética de estreptococos *mutans* nos pares mães-filhos.

foram tratados estatisticamente (pacote estatístico SPSS, correlação de Pearson ou Spearman e teste de Qui-quadrado) e correlacionados com a experiência de cárie nos pares com o objetivo de identificar associação significativa entre as variáveis biológicas e sócio-demográficas e o padrão de saúde bucal nesta população.

Foi feita a re-categorização dos índices CPO-D, ceo-d e de placa O'Leary (Tabelas 1, 2 e 3).

Tabela 1 – Re-categorização do índice CPO-D

<i>Índice CPO-D</i>	<i>CPO-D re-categorizado</i>
1 a 2,9	baixo
3 a 3,9	moderado
4 a +	alto

Tabela 2 – Re-categorização do índice ceo-d

<i>Índice ceo-d</i>	<i>ceo-d re-categorizado</i>
0	ausente
1 a 2,9	baixo
3 a 3,9	moderado
4 a +	alto

Tabela 3 – Re-categorização do índice de placa O'Leary

<i>Índice de placa O'Leary</i>	<i>ceo-d re-categorizado</i>
0 a 29	baixo
30 a 47,3	médio
47,4 a 62,4	alto
62,5 a +	altíssimo

5 RESULTADOS

5.1 Detecção de *S. mutans*, variáveis biológicas, comportamentais e sócio-demográficas estudadas e a ocorrência de cárie dentária nos pares mães-filhos.

Do total de 57 pares de mães-filhos, 98,2% completaram todas as etapas do presente estudo. Destas crianças 51,8% eram do gênero feminino e a maior parcela (71,4%) estava na faixa de 4 anos de idade. A maioria das mães (76,8%) não ultrapassou o ensino médio e pertenciam a famílias cuja renda mensal média era de 2 salários mínimos (Tabela 4).

Tabela 4- Características sócio-demográficas das crianças de 4 e 5 anos de idade matriculadas nos CEMEI's de Londrina-PR (N=56)

Características	N	%
Gênero da criança		
Masculino	27	48,2
Feminino	29	51,8
Idade da criança		
4 anos	40	71,4
5 anos	16	28,6
Escolaridade materna		
0 a 7 anos de estudo	21	37,5
8 a 10 anos de estudo	22	39,3
11 e + anos de estudo	13	23,2
Renda familiar (salário mínimo)		
0-1	6	10,7
1,1-2	17	30,4
2,1-3	16	28,6
3,1e +	17	30,4

A presença de *S. mutans* foi detectada em 50% das crianças. Em contrapartida, entre a maioria das mães (76,8%), esta presença não foi detectada (Tabela 5).

Tabela 5- Distribuição de *Streptococcus mutans* nas crianças de 4 e 5 anos matriculadas dos CEMEIs de Londrina-PR e suas respectivas mães (N=56)

		Detecção de <i>S.mutans</i>	
		N	%
Criança	Sim	28	50
	Não	28	50
Mãe	Sim	13	23,2
	Não	43	76,8

Como demonstrado na tabela 6 a proporção da presença de *S.mutans* foi maior no gênero masculino (53,6%) que no gênero feminino (46,4%).

Tabela 6- Detecção de *S.mutans* nas crianças de 4 e 5 anos dos CEMEIs de Londrina-Pr segundo o gênero (N=56)

		Gênero	
		Masculino N (%)	Feminino N(%)
<i>S.mutans</i>	Não	12(42,9)	16(57,1)
	Sim	15(53,6)	13(46,4)

n.s (não significativo)

Observou-se que em 53,8% das mães onde foi detectada a presença de *S.mutans* o mesmo acontecia em seus filhos (Tabela 7).

Tabela 7- Detecção de *S. mutans* nos pares mães-crianças dos CEMEIs de Londrina-Pr (N=56)

		<i>S.mutans</i> (mãe)	
		Não N (%)	Sim N(%)
<i>S.mutans</i> (criança)	Não	22 (51,2)	6(46,2)
	Sim	21 (48,8)	7(53,8)

n.s

Na população das crianças estudadas 57,1% encontravam-se livres de cárie contra 42,9% que já haviam tido ataque desta doença (Tabela 8).

Tabela 8- Distribuição das crianças de 4 e 5 anos de idade matriculadas nos CEMEIs de Londrina-PR segundo a experiência de cárie (N=56)

Experiência de cárie	N	%
Livre de cárie	32	57,1
Com ataque de cárie	24	42,9

O índice médio de cárie foi de 11,02 (6,29). Houve correlação estatisticamente significativa entre renda familiar e idade materna ($p < 0,05$) e entre esta e escolaridade materna ($p < 0,01$). Verificou-se também correlação positiva entre CPO-D e idade materna ($p < 0,01$) e entre os índices de cárie e higiene oral ($p < 0,01$). A correlação ($p < 0,05$) entre a presença de *S.mutans* e índice de higiene oral foi negativa (Tabela 9).

Tabela 9- Correlação entre características sociais, demográficas e biológicas nas mães das crianças de 4 a 5 anos matriculadas nos CEMEIs de Londrina-PR (N=56)

	Coefficiente de Spearman	
		Nível de Significância
Renda familiar x idade materna	-0,325*	$p < 0,05$
CPO-D x idade materna	0,610**	$p < 0,01$
Renda familiar x escolaridade materna	0,346**	$p < 0,01$
Presença de <i>S.mutans</i> x Índice de higiene	-0,273*	$p < 0,05$
CPO-D x Índice de higiene	0,356**	$p < 0,01$

O ceo-d médio encontrado foi de 2,09 (3,21). Este índice estava inversamente correlacionado com a renda familiar ($p < 0,05$), da mesma forma que o índice de placa e a escolaridade materna (Tabela 10). Vale destacar que o índice de O'Leary médio foi de 48,26 (18,69).

Tabela 10- Correlação entre características sociais, demográficas e biológicas das crianças de 4 e 5 anos matriculadas nos CEMEIs de Londrina-PR (N=56)

	Coefficiente de Spearman	
		Nível de Significância
CEO-D x renda familiar	-0,263*	$p < 0,05$
Índice de placa x escolaridade materna	-0,264*	$p < 0,05$

Na tabela 11 pode-se constatar que a história de cárie das crianças estava inversamente relacionada com a renda familiar. Na maioria das crianças (83,3%) que tiveram ataque de cárie a renda familiar não ultrapassava 1 salário mínimo. Por outro lado entre as famílias que possuíam renda acima de 3 salários mínimos, encontrava-se a maior proporção de crianças livres de cárie (70,6%).

Tabela 11- Experiência de cárie e renda familiar das crianças de 4 e 5 anos matriculadas nos CEMEIs de Londrina-Pr (N=56)

		EXPERIÊNCIA DE CÁRIE			
		Livre de Cárie		Com Cárie	
		N	%	N	%
Renda Familiar	0-1	1	16,7	5	83,3
	1,1-2	9	52,9	8	47,1
	2,1-3	10	62,5	6	37,5
	3,1 e +	12	70,6	5	29,4

Teste Qui-quadrado – n.s.

Proporções similares de mães, independente da ausência ou presença de *S.mutans*, apresentaram alta severidade de cárie. Nenhuma mãe com índice moderado de cárie apresentou *S.mutans* (Tabela 12).

Tabela 12- Detecção de *S. mutans* e severidade da cárie dentária nas mães das crianças de 4 e 5 anos matriculadas nos CEMEIs de Londrina-PR (N=54)

	SEVERIDADE DE CÁRIE		
	Baixo N (%)	Moderado N (%)	Alto N (%)
<i>S.mutans</i>			
SIM	1(8,3)	-	11(91,7)
NÃO	3(7,1)	2(4,8)	37(88,1)

Ao relacionar o índice ceo-d com a presença de *S.mutans* observou-se que na maioria das crianças em que foi detectada a presença da bactéria (64,3%) o índice foi zero (Tabela 13).

Tabela 13- Detecção de *S. mutans* e severidade de cárie dentária nas crianças de 4 e 5 anos matriculadas nas CEMEIs de Londrina-PR (N=56)

	SEVERIDADE DE CÁRIE			
	Ausência N(%)	Baixo N (%)	Moderado N (%)	Alto N (%)
<i>S.mutans</i>				
SIM	18(64,3)	1(3,6)	2(7,1)	7(25)
NÃO	14(50)	5(17,9)	1(3,6)	8(28,6)

Mães com presença de *S.mutans* apresentavam a maior proporção de crianças livres de cárie (76,9%) (Tabela 14).

Tabela 14- Detecção de *S.mutans* das mães e severidade de cárie nas crianças de 4 e 5 anos matriculadas nos CEMEIs de Londrina-PR (N=56)

	SEVERIDADE DE CÁRIE			
	Ausência N(%)	Baixo N (%)	Moderado N (%)	Alto N (%)
<i>S.mutans</i>				
SIM	10(76,9)	-	-	3(23,1)
NÃO	22(51,2)	6(14)	3(7)	12(28)

5.2 Genotipagem

De um total de 560 isolados selecionados de placa contendo ágar Bacitracina e sacarose, 329 (58,7%) foram identificados como *S. mutans*. A amplificação de DNA a partir de linhagens *S. mutans* com o primer OPA-02 resultou em 5-7 fragmentos (amplicons), de 250 a 800 pb de tamanho.

A figura 2 mostra um exemplo do padrão de perfil de bandas dos isolados de *S. mutans* obtidos com o primer OPA-02 para o par de número 2. Em geral, linhagens com perfil de bandas similares ou idênticas foram facilmente reconhecidas visualmente.

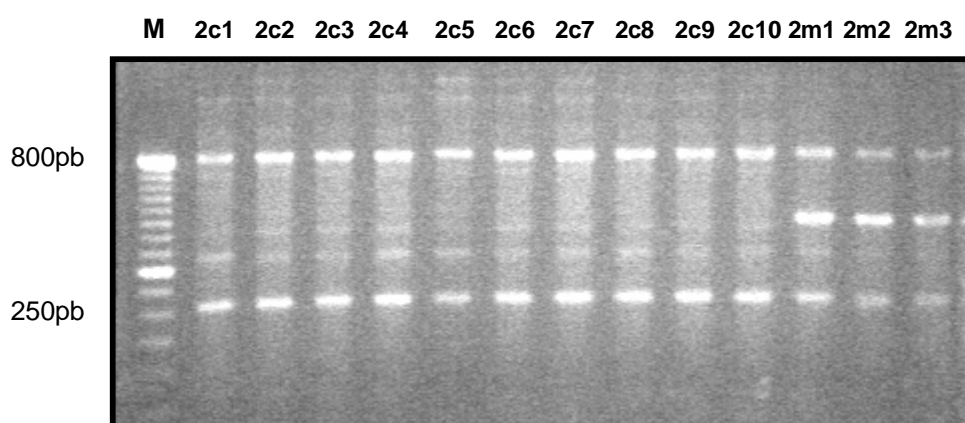


Figura 2. Perfis de DNA gerados por AP-PCR dos isolados do par 2. Linha 1, Marcador de peso molecular 50pb DNA ladder; linhas 2 a 11, criança 2; linhas 12 a 15, mãe 2.

Os genótipos de *S. mutans* detectados nos pares mães-crianças mostraram a ocorrência de transmissão vertical em um sub-grupo correspondendo a 40% dos pares mães-crianças (Figura 3).

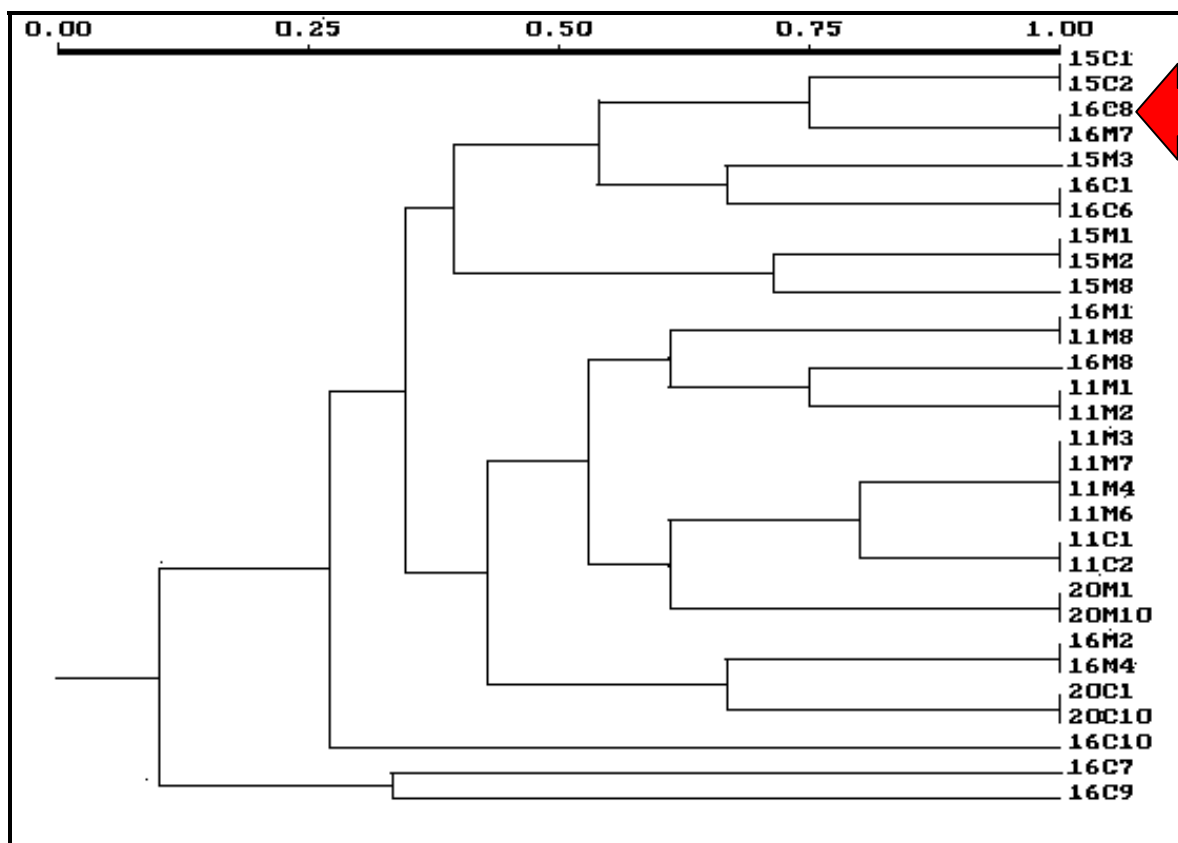


Figura 3. Dendrograma baseado nos perfis de AP-PCR. O coeficiente de Jaccard foi gerado à partir de análise UPGMA baseado na comparação da matriz de similaridade das linhagens isoladas de *S. mutans*. A seta indica a transmissão de um genótipo da mãe para a criança.

Considerando que alguns genótipos detectados nas crianças não foram achados em suas mães, foi comparado, então os genótipos de *S. mutans* observados nas crianças que estavam no mesmo CEMEI. Uma transmissão horizontal foi observada (60%), como pode ser observado na figura 4.

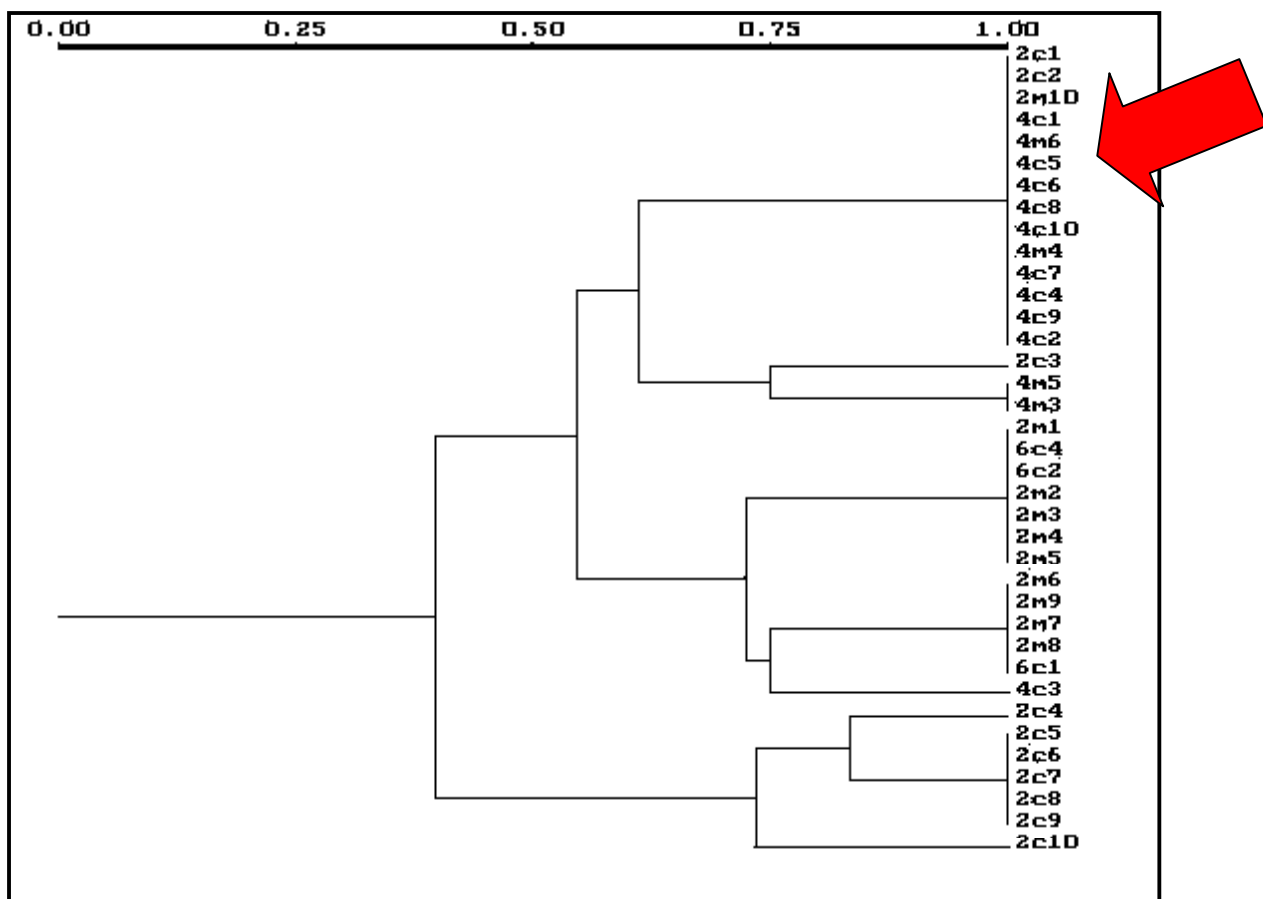


Figura 4. Dendrograma baseado nos perfis de AP-PCR. O coeficiente de Jaccard foi gerado à partir de análise UPGMA baseado na comparação da matriz de similaridade das linhagens isoladas de *S. mutans*. A seta indica a transmissão de um genótipo entre as crianças de um mesmo CEMEI.

As crianças apresentaram de 1 a 5 genótipos distintos de *S. mutans*; entre estas crianças somente uma (a do par 16), mostrou 5 genótipos distintos, 4 deles não foram adquiridos de sua mãe (Figura 5).

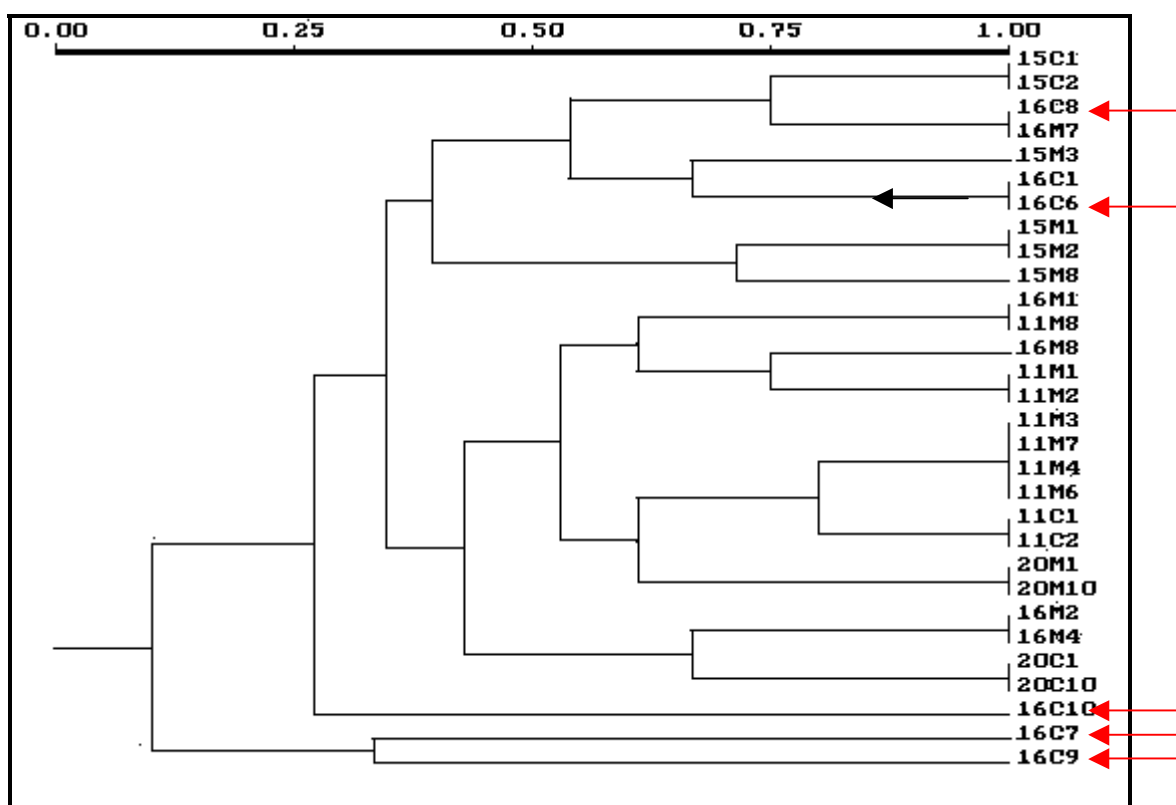


Figura 5. Dendrograma baseado nos perfis de AP-PCR. O coeficiente de Jaccard foi gerado à partir de análise UPGMA baseado na comparação da matriz de similaridade das linhagens isoladas de . As setas indicam a presença de 5 genótipos distintos de *S. mutans* para a criança do par 16 e pode se verificar que somente um genótipo foi compartilhado pela mãe.

Entre as linhagens de *S. mutans* isoladas das cavidades bucais das mães, até 4 genótipos distintos foram encontrados. A mãe do par 16 apresentou 4 genótipos diferentes e transmitiu apenas 1 para a criança (Figura 5).

6 DISCUSSÃO

A cárie dentária é uma doença multifatorial e a sua incidência não está relacionada somente com dieta e funções salivares, mas também com o estabelecimento de uma microbiota cariogênica.

Streptococcus mutans é um microrganismo predominante da microbiota bucal na maioria dos indivíduos e tem a capacidade de converter açúcares em ácido láctico, diminuindo o pH e conseqüentemente desmineralizando o esmalte dos dentes. A presença ou ausência desta bactéria pode ser um forte preditor de alta ou baixa susceptibilidade à cárie dentária.

A transmissão de estreptococos do grupo *mutans* e a colonização na cavidade bucal são fatores importantes para a prevenção da cárie dentária.

Os resultados deste trabalho mostraram que a prevalência de *S. mutans* foi de 50% nas crianças e somente em 23% das mães esta presença foi detectada. Okada *et al* (2005), Köhler *et al* (1995); Li *et al* (1994) também observaram a presença desta bactéria em crianças de 3 a 5 anos de idade.

A detecção de uma seqüência do gene *spaP* de *S. mutans* em amostras da placa dentária através da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi relatada também nos estudos de Galaviz e Garcia (2003) que detectaram e identificaram uma seqüência de 192pb do gene *spaP* para avaliar a presença de cepas potencialmente cariogênica de *S. mutans* usando DNA isolado de amostras da placa dental; e Okada

et al (2002) que utilizaram amostras de placa coletadas de dentes de crianças entre 3 a 5 anos de idade. Através deste método é possível avaliar de forma rápida e precisa diretamente da placa, sem a necessidade de utilizar meios seletivos para o crescimento da bactéria, estabelecendo assim um sistema mais imediato e qualitativo de controle e risco de cárie dental.

Apesar de 50% das crianças apresentarem *S. mutans*, o ceo-d médio encontrado foi de 2,09(3,21), ou seja, baixo. Em contrapartida o índice de O'Leary médio verificado foi 48,26(18,69), considerado alto. Estes dados corroboram com o estudo de Galaviz e Garcia (2003) que afirmaram ser mais importante a presença de *S. mutans* com potencial cariogênico do que o alto acúmulo de placa. Além de que existem outros fatores-chave que contribuem para a presença da doença cárie, entre eles o consumo de açúcar (quantidade e freqüência) e susceptibilidade do indivíduo.

Das 13 mães que apresentavam esta bactéria cariogênica, em 7 delas foi detectada a presença também em seus filhos. Foi encontrada uma correlação positiva entre CPO-D e índice de higiene oral (0,356 / $p < 0,01$) e entre este índice e idade materna (0,610/ $p < 0,01$).

A presença de *S. mutans* e índice de higiene oral mostrou uma correlação negativa (-0,273/ $p < 0,05$), isto pode ser explicado pelo fato de que o *S. mutans* é mais presente em lesões de cárie aberta onde se encontra um meio mais ácido. Neste estudo o elemento mais prevalente do índice CPO-D, foi o obturado. Vale ressaltar que a idade média das mães foi de 31 anos e receberam, quando crianças, tratamento odontológico curativo.

Atualmente a prática odontológica é voltada para a prevenção. Neste estudo isto pode ser observado quando o componente cariado foi o responsável pela totalidade do índice ceo-d.

A identificação da fonte de transmissão de *S. mutans* é essencial para o desenvolvimento de estratégias para a prevenção de cárie dental.

O presente estudo sugere uma transmissão horizontal de *S. mutans* em 60% dos pares analisados. Este dado corrobora com os estudos de Zhou *et al* (2005) que através da AP-PCR encontraram os mesmo genótipos entre crianças de 3 e 4 anos de idade de uma mesma creche; Tedjosasongko, Kozai (2002) que encontraram evidências da transmissão horizontal em crianças de 0 a 5 anos de uma creche no Japão ; e Spolidorio *et al* (2003) que determinaram através da técnica de AP-PCR a capacidade de diferenciar clones geneticamente distintos de *S. mutans* e estabeleceram o grau de similaridade intrafamiliar. Verificaram que cepas de *S. mutans* dos bebês tinham similaridade genética com as cepas dos irmãos mais velhos. Mas difere dos relatados por Klein *et al* (2004); Li e Caufield (1995) que observaram a transmissão vertical. É importante enfatizar que as crianças analisadas neste estudo ficavam 5 dias por semana, 10 horas por dia nos CEMEIs, o mesmo padrão foi verificado no estudo de Mattos-Graner *et al* (2001), que também encontraram a transmissão horizontal.

Relatos recentes em literatura indicam que a transmissão vertical não é o vetor principal pelo qual *S. mutans* é perpetuado nas populações humanas. Mattos-Graner *et al.* (2001) isolaram *S. mutans* de crianças atendidas em creches (12-30

meses de idade) e genotiparam os isolados através da PCR/RFLP. Observaram que muitas crianças apresentaram genótipos idênticos de *S. mutans*, indicando que a transmissão horizontal deve ser um outro vetor para a aquisição desse microrganismo. Tanner *et al.* (2004) avaliaram a similaridade entre a microbiota oral de crianças e de suas atendentes nas creches. O perfil microbiano das crianças foi associado fortemente com a microbiota de suas atendentes na creche.

Neste estudo foi evidenciado que as crianças apresentavam de 1 a 5 genótipos de *Streptococcus mutans* distintos. Este dado está em acordo com relatos da literatura que reportam que crianças em diferentes idades abrigam esta diversidade genotípica. (ALALUUSUA *et al*, 1996; CAUFIELD E WALKER, 1989; EMANUELSSON, LI e BRATTHALL, 1988; LI E CAUFIELD, 1995).

Esta diversidade genotípica pode estar associada à colonização por genótipos com diferentes características de virulência e deve acarretar graus diversos de severidade da cárie dentária, somando-se a dieta e padrões de higiene da cavidade bucal.

Assim, estudos que venham a ampliar os conhecimentos sobre a existência de diferentes genótipos de *Streptococcus mutans* na cavidade oral, suas relações entre a virulência e a atividade de cárie, com o emprego de técnicas moleculares mais adequadas, permitirá uma maior compreensão do desenvolvimento desta doença.

7 CONCLUSÕES

Após análise dos dados coletados pode-se concluir que:

- Baixo índice de ceo-d foi observado na maioria das crianças;
- O índice de placa O'Leary médio apresentado pelas crianças foi alto;
- As mães apresentaram altos índices de CPO-D e higiene oral precária.
- Em 50% das crianças e 23,2% das mães foi detectada a presença de Sm;
- Houve associação positiva estatisticamente significativa entre as variáveis de estudo das mães: severidade de cárie, índice de higiene, idade materna, renda familiar e escolaridade materna.
- Houve associação negativa estatisticamente significativa entre as variáveis de estudo das crianças: índice de placa, severidade de cárie, renda familiar e escolaridade materna;
- Houve uma tendência à transmissão horizontal de genótipos de *S. mutans* entre as crianças (60%);

Esses achados provavelmente facilitarão o desenvolvimento de estratégias clínicas para a prevenção ou diminuição da infecção de crianças por esse microrganismo reduzindo, então, a prevalência de cáries dentárias.

REFERÊNCIAS

- AALTONEN, A.S. The frequency of mother-infant salivary close contacts and maternal caries activity affect caries occurrence in 4-year-old children. **Proced Finn Dent Soc.**, v.87, n.3, p.373-82, 1991.
- ALALUUSUA, S.; et al. Oral Colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. **Archs oral Biol.**, v.41, n.2, p.167-173, 1996.
- ALALUUSUA, S.; MALMIVIRTA, R. Early plaque accumulation – a sign for caries risk in young children. **Community Dent. oral Epidem.**, v. 22, p. 273-6, 1994.
- ALALUUSUA, S.; RENKONEN, O. V. Streptococcus mutans establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. **Scand J Dent Res**, v.91, p.453-7, 1982.
- ALALUUSUA, S.; RENKONEN, O.V. *Streptococcus mutans* establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 91, p. 453-7, 1983.
- ANLIKER, J.A.; et al. Children's food preferences and genetic sensitivity to the bitter taste of 6-n-propylthiouracil. **Am J Clin Nutr.**, v.54, n.2, p.316-20, 1991.
- BARONE, S.; MACEDO, C.; MARIN, J.M. Arbitrarily primed polymerase chain reaction for fingerprinting the genotype identification of mutans streptococci in children with Down syndrome. **Spec Care Dentist.**, v.25, n.1, p.37-42, 2005.
- BERKOWITZ, R.J. Etiology of nursing caries: a microbiologic perspective. **J. Publ. Health Dent.**, v. 56, n. 1, p. 51-4, Spring 1996.
- BERKOWITZ, R. J.; TURNER, J.; GREEN, P. Maternal salivary levels of Streptococcus mutans and primary oral infection in infants. **Arch Oral Biol**, v.26, n.2, p.147-149, 1981.
- BERKOWITZ R. J.; JORDAN, H. Similarity of bacteriocins and Streptococcus mutans from mother and infant. **Arch Oral Biol**, v.20, n.11, p. 725-30, 1975.
- BERKOWITZ, R. J.; JONES, P. Mouth-to-mouth transmission of the bacterium Streptococcus mutans between mother and child. **Arch Oral Biol**, v.30, n.4, p.377-9, 1985.
- BLINKHORN, A. S. Dental preventive advice for pregnant and nursing mothers – sociological implications. **Int. dent. J.**, v. 31, n. 1, p. 14-22, 1981.
- BOWDEN, G.H. Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? **Community Dent Oral Epidemiol.**, v.25, n.1, p.76-81, 1997.

CAUFIELD, P.W.; CUTTER, G.R.; DASANAYAKE, A.P. Inicial acquisition of *Mutans streptococci* by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **J. dent. Res.**, v. 72, n. 1, p. 37-45, Jan. 1993.

CAUFIELD, P. W.; WANNEMUEHLER, Y.; HENSEN, J. Familiar clustering of the *Streptococcus mutans* cryptic plasmid strain in a dental clinic population. **Infect Immun**, v.38, n.2, p.785-7, 1982.

CAUFIELD, P. et al. Plasmids in *Streptococcus mutans*; usefulness as epidemiological markers and association with mutacins. In: Hamada S, Michaelek S, Kiyono H, Menaker L, McGhee J, editors. **Proceedings on an international conference on cellular, molecular and clinical aspects of *Streptococcus mutans***. Birmingham, AL: Elsevier Science Publishers, p.217-23, 1985.

CAUFIELD, P. W.; CHILDERS, N. K.; ALLEN, D.; HANSEN, J. B. Distinct bacteriocins correlate with different groups of *Streptococcus mutans* plasmids. **Infect Immun**, v.48, n.1, p.51-6, 1985.

CAUFIELD, P. W.; RATANPRIDAKUL, K.; ALLEN, D. N.; CUTTER, G. R. Plasmidcontaining strains of *Streptococcus mutans* cluster within family and racial cohorts: implication for natural transmission. **Infect Immun**, v.56, n.12, p.216-20, 1988.

DAVEY, A. L.; ROGERS, A. H. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. **Arch Oral Biol**, v.29, n.6, p.453-60, 1984.

EDWARDS, T. S. F.; ROWNTREE, F. St. D. Dental attitudes of primigravid women. **J. Periodont. Res.**, v. 4, n. 4, p. 325-32, 1969.

EMANUELSON, I. R. et al. Genotyping shows diferent strains of mutans between father and child and within parental pairs in Swedish families. **Oral microbial Immunol.**, v.13, n.5, p.271-7, 1998.

ERSIN N. K. et al. Transmission of *S. mutans* in a group of Turkish families. **Oral microbial Immunol.**, v.19, n.6, p.408-410, 2004.

FÉDÉRATION DENTAIRE INTERNATIONALE. Global goals for oral health in the year 2000. **Int. Dent. J.**, London, v.32, p.74-77, 1982.

FLORIO, F. M. et al. Time of inicial acquisition of mutans streptococci by human infants. **The J. of Clin Ped Dent**, v.28, n.4, 2004.

FUJIWARA, T.; SASADA, E.; MIMA, N.; OOSHIMA, T. Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2-year-old children of Japan. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.19, n.3, p.151-4, 1991.

GALAVIZ, L. A. A.; GARCIA, I. C. E. Deteccion de una secuencia del gene spaP de streptococcus mutans en muestras de placa dental mediante reacción en cadena de la polimerase (PCR). **Revista ADM**, v. LX, n.5, p.180-84, 2003.

GRINDEFJORD, M.; DAHLLOF, G.; NILSSON, B.; MODEER, T. Stepwise prediction of dental caries in children up to 3.5 years of age. **Caries Res**, v.30, n.4, p.256-66, 1995.

GRINDEFJORD, M. et al. Caries prevalence in 2.5-year-old children. **Caries Res.**, v. 27, p. 505-10, 1993.

GRINDEFJORD, M. et al. Prediction of dental caries development in 1-year-old children. **Caries Res.**, v. 29, p. 343-8, 1995.

GRÖNROOS, L.; ALALUUSUA, S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by AP-PCR fingerprinting. **Caries Res.**, v.34, p.474-480, 2000.

HONKALA, E.; MYYSSONEM, V.; REMPELA, A. Determinants of frequency of children's sweets consumption. **Acta Odontol. Pediatric.**, Santo Domingo, v. 5, p.13-19, 1984.

IGARASHI, T. et al. Direct detection of *S. mutans* in human dental plaque by PCR. **Oral Microbiol Immunol.**, v.11, n.5, p.294-8, 1996.

KEYES, P.H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. **Arch. oral Biol.**, v.1, p.304-20, 1960.

KLEIN, H. The family and dental disease. IV. Dental disease (DMF) experience in parents and offspring. **J. Amer. dent. Ass.**, v. 33, p. 735-43, June, 1946.

KLEIN, M. I. et al. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *S. mutans* and *S. sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. **J of Clin Microbiol**, v42, n.10, p.4620-26, 2004.

KOHLER, B.; ANDREEN, I.; JONSSON, B. The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at 4 years of age. **Oral Microbiol Immunol**, v.3, n.1, p.14-17, 1988.

KULKARNI, G. V.; CHAN, K. H.; SANDHAM, H. J. An investigation into the use of restriction endonuclease analysis in the study of transmission of mutans streptococci. **J Dent Res**, v.68, n.7, p.1155-61, 1989.

LI, Y.; CAUFIELD, P. W. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. **J. Dent. Res.**, v.74, n.2, p.681-85, 1995.

LI, Y.; CAUFIELD, P. W. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. **Oral Microbiol Immunol**, v.13, p.17-22, 1998.

LINDQUIST, B.; EMILSON, C. G. Colonization of *S. mutans* and *S. sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. **Caries Res**, v.38, p.95-103, 2004.

LOESCHE, W.J. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. **Microbiol Rev.**, v.50, n.4, p.353-80, 1986.

MARTINS, A. L. C. F. et al. A cárie dentária. In: **Odontopediatria na primeira infância**. São Paulo, Ed. Santos, 1998. Cap. 17, p. 195-208.

MATTOS-GRANER, R. de O. et al. Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-year-old Brazilian children. **Caries Res.**, v. 32, n. 5, p. 319-23, 1998.

MATTOS-GRANER, R. de O. et al. Caries prevalence in 6-36-month-old Brazilian children. **Community dent. Health**, v. 13, p. 96-8, 1996.

MATTOS-GRANER, R. de O. et al. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.6, p.2313-16, 2001.

McCABE, M.; KINIRONS, M. Dental caries and dental registration status in nursery school children in Newry, Northern Ireland. **Community dent. oral Epidem.**, v. 23, p. 69-71, 1995.

MILNES, A. R. Description and epidemiology of nursing caries. **J. Publ. Health. Dent.**, v. 56, n. 1, p. 38-50, Spring 1996.

NAPIMOGA, M. H. et al. Genotypic diversity and virulence traits of S. mutans in caries-free and caries-active individuals. **J. Med. Microbiol.**, v.53, p.697-703, 2004.

OHO, T. et al. Simple and rapid detection of S. mutans and S. sobrinus in human saliva by PCR. **Oral Microbiol Immunol**, v.15, p.258-262, 2000.

OKADA, M. et al. PCR detection of streptococcus mutans and sobrinus in dental plaque samples from Japanese pre-school children. **J. Med. Microbiol.**, v.51, p.443-47, 2002.

OKADA, M. et al. Longitudinal study of dental caries incidence associated with S. mutans and S. sobrinus in pre-school children. **J. Med. Microbiol.**, v.54, p.661-65, 2005.

ONO, T. et al. Detection of S. mutans by PCR amplification of spaP gene. **J. Med. Microbiol.**, v.41, n.4, p.231-5, 1994.

PEREZ, M.S. et al. Avaliação do CPOS modificado, do índice de placa visível e de sangramento gengival em 30 pares mãe-filho. **Cecade News**, v. 4, n. 1 / 2, p. 35-45, jan./ago. 1996.

REDMO EMANUELSON, I.; THORNQVIST, E. Genotypes of mutans streptococci tend to persist in their host for several years. **Caries Res**, v.34, p.133-39, 2000.

ROETERS, F. J.; VAN DER HOEVEN, J. S.; BURGERSDIJK, R. C.; SCHAEKEN, M. J. Lactobacilli, mutans streptococci and dental caries: a longitudinal study in 2-year-old children up to the age of 5 years. **Caries Res**, v.29, n.4, p.272-9, 1995.

SAARELA, et al. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Arch Oral Biol.**, v.41, n.8-9, p.821-6, 1996.

SARNAT, H.; KAGAN, A.; RAVIV, A. The relation between mothers attitude toward dentistry and the oral status of their children. **Pediat. Dent.**, v. 6, n. 3, p. 128-31, 1984.

SCHRODER U.; GRANATH, L. Dietary habits and oral hygiene as predictor of caries in 3-year-old children. **Communit Dent Oral Epidemiol.**, v.11, n.5, p.308-11, 1983.

SPOLIDORIO, D. M. P. et al. Genetic polymorphism of S. mutans in brazilian family members. **Brazilian J. of Microbiol.**, v.34, p.213-17, 2003.

SHEIN, B.; TSAMTSOURIS, A.; ROVERO, J. Self reported compliance and the effectiveness of prenatal dental education. **J. Clin. Ped. Dent**, v. 15, n. 2, p. 102-108, 1991.

TANNER, A. C. et al. Similarity of the oral microbiota of pre-school children with that of their caregivers in a population-based study. **Oral Microbiol Immunol**, v.17, n.6, p.379-87, 2002.

TANNER, A. C. et al. The microbiota of young children from tooth and tongue samples. **J Dent Res**, v.81, n.1, p.53-7, 2002.

TEDJOSASONGKO, U.; KOZAI, K. Initial acquisition of mutans streptococci in children at day nursery. **ASDC J Dent Child**, v.69, n.3, p.284-8, 2002.

TINANOFF N.; PALMER, C.A. Dietary determinants of dental caries and dietary recommendations for preschool children. **J Public Health Dent.**, v.60, n.3, p.197-206, 2000.

TSAMTSOURIS, A.; STACK, A.; PADAMSEE, M. Dental education of expectant parents. **J. Pedod.**, v. 10, n. 4, p. 309-22, 1986.

WENDT, L.K.; HALLONSTEN, A.L.; KOCH, G. Dental caries in one- and two-years-old children living in Sweden. **Swed. dent. J.**, v. 15, p. 1-6, 1991.

WENDT, L.K.; HALLONSTEN, A.L.; KOCH, G. Oral health in preschool children living in Sweden. **Swed. dent. J.**, v. 16, p. 41-9, 1992.

WENDT, L.K.; et al. Oral hygiene in relation to caries development and immigrant status in infants and toddlers. **Scand J Dent Res.**, v. 102, n.5, p.269-73, 1994.

ZHOU, J. et al. Study on the horizontal transmission of oral S. mutans in children. **Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v.23, n.5, p.388-90, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1**Universidade Norte do Paraná**

Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão

Londrina, 01 de abril de 2005.

Ilustríssima Senhora
Prof.^a CARMEM LUCIA BACCARO SPOSTI
Secretária Municipal de Educação de Londrina- PR.

O Programa de Mestrado em Odontologia da Unopar obteve aprovação e recomendação pela CAPES/MEC (NS/CAPES 2634 – 12/12/2003), tendo iniciado a capacitação da 1^a. Turma de acadêmicos em maio de 2004. Entre os objetivos do referido curso de pós-graduação *Stricto Sensu*, está a formação de profissionais dotados de espírito crítico e reflexão ética, habilitados tanto a identificar, à luz dos novos conhecimentos e tecnologias desenvolvidas, os principais problemas bucais que afligem indivíduos e populações; bem como o planejamento, implementação e avaliação de ações de promoção, prevenção e recuperação da saúde da boca.

Assim, além de possibilitar a multiplicação do conhecimento e criação de núcleos de intercâmbio didático-científico, espera-se contribuir, através das pesquisas a serem conduzidas, para a melhoria das condições de saúde bucal e geral dos sub-grupos populacionais envolvidos.

Dentro das seguintes linhas de pesquisas: Estudos Epidemiológicos em Odontologia: Avaliação de Indicadores de Risco das Doenças Bucais e Odontologia para Bebês, alguns docentes, em conjunto com seus respectivos orientandos se propuseram a trabalhar com a população pré-escolar. Daí surgiu a idéia de se desenvolver alguns estudos junto aos Centros Municipais de Educação Infantil.

Inicialmente, dois projetos foram elaborados: “RELAÇÃO ENTRE A PREFERÊNCIA PALADAR AO DOCE, O PADRÃO DE SAÚDE BUCAL E O ESTADO NUTRICIONAL EM CRIANÇAS DE CRECHES PÚBLICAS DE LONDRINA-PR.” e “ÁVALIAÇÃO DE INDICADORES BIOLÓGICOS, COMPORTAMENTAIS E SÓCIO-DEMOGRÁFICOS DE RISCO À CÁRIE EM PARES MÃES/FILHOS NA CIDADE DE LONDRINA-PR”, ambos devendo ser conduzidos junto a uma amostra representativa de crianças na faixa etária de 4 a 6 anos, matriculadas nos 11

Centros Municipais de Educação Infantil (C.M.E.I.), localizados na região urbana. Ressaltamos que cartas de esclarecimento sobre as referidas pesquisas serão encaminhadas às mães e que somente participarão, aquelas que estiverem de acordo, assinando os termos de consentimento.

Os referidos projetos se encontram em anexo, já tendo sido aprovados pela Pró-Reitoria de Pós-graduação, Pesquisa e Extensão da UNOPAR e pelo Comitê de Ética da instituição, sendo a execução dos mesmos de inteira responsabilidade da UNOPAR.

Em resposta à solicitação de autorização para a realização dos dois estudos citados junto à Secretaria Municipal de Educação, foi nos encaminhado o OF. N° 539/04-GAB-S.M.E, que propôs um estudo piloto no C.M.E.I. Malvina Poppi Pedriali. Tal estudo já foi conduzido.

Isto posto, reforçamos a solicitação de que haja autorização para a continuidade dos estudos nos demais centros. A meta é que as defesas das dissertações de mestrado ocorram em dezembro/2005, sendo assim há uma certa urgência quanto à resposta a nossa solicitação.

Certos de podermos contar com sua importante colaboração para a realização destes trabalhos, agradecemos antecipadamente a atenção e colocamo-nos à disposição para os esclarecimentos necessários.

PROF. DR. LUIZ REYNALDO DE FIGUEIREDO WALTER
Coordenador do Curso de Mestrado em Odontologia da Unopar

Prof^a. Dr^a. Sandra Mara Maciel
Pesquisadora Responsável

Prof^a. Dr^a. Regina Poli
Frederico
Pesquisadora Responsável

ANEXO 2



Universidade Norte do Paraná

PESQUISA SOBRE A RELAÇÃO ENTRE A PREFERÊNCIA PALADAR AO DOCE, O PADRÃO DE SAÚDE BUCAL E O ESTADO NUTRICIONAL DE CRIANÇAS DOS CENTROS MUNICIPAIS DE EDUCAÇÃO INFANTIL, DE LONDRINA-PR.

CARTA DE INFORMAÇÃO AO RESPONSÁVEL

Prezada mãe:

A Unopar, através de seu Curso de Mestrado em Odontologia e do Curso de Nutrição, pretende desenvolver algumas pesquisas junto às mães e as crianças matriculadas nos Centros Municipais de Educação Infantil de Londrina-Pr. Estas pesquisas serão úteis para que, em uma etapa posterior, ações de controle da cárie dentária e de problemas nutricionais nas crianças sejam planejadas e desenvolvidas por professores e alunos. Os estudos iniciais terão os seguintes objetivos:

- Avaliar a preferência paladar pelo doce em crianças de 4 e 5 anos de idade.
- Avaliar a experiência de cárie e o padrão de higiene bucal das crianças.
- Avaliar o estado nutricional de crianças de 4 e 5 anos de idade.
- Avaliar o nível de conhecimento e as práticas maternas em saúde bucal.

Para tanto, serão adotados procedimentos que já foram amplamente utilizados em pesquisas/estudos anteriores e que se mostraram totalmente seguros. Resumidamente, serão realizados:

- o exame clínico da boca da criança: para verificar as condições de seus dentes; a utilização de corantes para avaliação do grau de higiene bucal.
- A degustação de 5 soluções de chá, adoçadas com diferentes quantidades de açúcar: para se avaliar o grau de preferência pelo doce.
- A tomada de medidas de peso e altura das crianças.

E, finalmente, será conduzida uma entrevista com a mãe da criança: para se avaliar suas práticas no cuidado da saúde bucal de seu filho(a).

Será garantido à mãe participante: que receba respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa; a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo; a segurança de que não será identificada e de que se manterá o caráter confidencial da informação relacionada com sua privacidade.

.....

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, a Sra. _____, portadora da cédula de identidade no. _____, após leitura minuciosa da **CARTA DE INFORMAÇÃO AO RESPONSÁVEL**, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos procedimentos aos quais seu(sua) filho(a) será submetido(a), não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**, concordando em participar da pesquisa proposta.

Por estarem de acordo, assinam o presente termo.

Assinatura da Mãe

Assinatura do(a) Pesquisador(a)

Londrina-PR, ____ de _____ de _____.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)