

AMANDA BEATRIZ DAHDAH ANICETO DE FREITAS

**EXPERIÊNCIA DE CÁRIE DENTÁRIA E PRESENÇA DE  
ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS EM INDIVÍDUOS  
COM FISSURAS LÁBIO-PALATINAS: Estudo transversal  
controlado.**

FACULDADE DE ODONTOLOGIA - UFMG

Belo Horizonte

2011

AMANDA BEATRIZ DAHDAH ANICETO DE FREITAS

**EXPERIÊNCIA DE CÁRIE DENTÁRIA E PRESENÇA DE  
ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS EM INDIVÍDUOS  
COM FISSURAS LÁBIO- PALATINAS: Estudo transversal  
controlado.**

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Silami de Magalhães

Co-orientador: Prof. Dr. Allyson Nogueira Moreira

FACULDADE DE ODONTOLOGIA - UFMG

Belo Horizonte

2011

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFMG

Freitas, Amanda Beatriz Dahdah Aniceto de

EXPERIÊNCIA DE CÁRIE DENTÁRIA E PRESENÇA DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS EM INDIVÍDUOS COM FISSURAS LÁBIO-PALATINAS: Estudo transversal controlado [manuscrito] / Amanda Beatriz Dahdah Aniceto de Freitas. - 2011.

117 p. : il.

Orientador: Claudia Silami de Magalhães.

Coorientador: Allyson Nogueira Moreira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

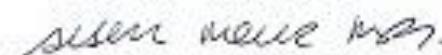
1.Cárie dentária. 2.fissura lábio palatina. 3.estudo transversal controlado. 4.microrganismos carogênicos. I.Magalhães, Claudia Silami de. II.Moreira, Allyson Nogueira. III.Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV.Título.

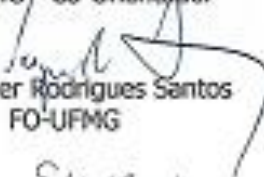


UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE DONTOLOGIA  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Tese intitulada "*Experiência de cárie dentária e presença de estreptococos do grupo mutans em indivíduos com fissuras lábio-palatinas: estudo transversal controlado*", área de concentração em **Clinica Odontológica**, apresentada por **Amanda Beatriz Dahdah Aniceto de Freitas**, para obtenção do grau de **Doutor em Odontologia**, **APROVADA** pela Comissão Examinadora constituída pelos seguintes professores:

  
Dra. Cláudia Silami de Magalhães  
FO-UFMG - Orientadora

  
Dr. Allyson Nogueira Moreira  
FO-UFMG - Co-Orientador

  
Dr. Vagner Rodrigues Santos  
FO-UFMG

  
Dra. Elizabeth Maria Bastos Lages  
FO-UFMG

  
Dr. Herclito Martelli Junior  
UNIMONTES

  
Dr. Cassio Vicente Pereira  
UNILAVRAS

  
Prof. Dr. Saul Martins de Paiva  
Coordenador do Colegiado do  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Belo Horizonte, 23 de setembro de 2011.

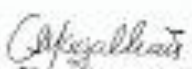


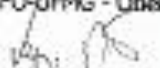
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Faculdade de Odontologia  
Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia  
Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha  
Belo Horizonte - MG - 31.270-901  
Tel: (31) 3409 2470 Fax: (31) 3409 2472  
Email: posgrad@odonta.ufmg.br




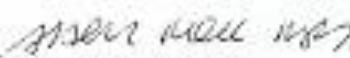
Ata da Comissão Examinadora para julgamento da Tese de Doutorado em Odontologia, área de concentração em **Clinica Odontológica**, da candidata **Amanda Beatriz Dahdah Aniceto de Freitas**.

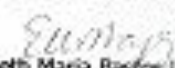
Aos 23 de setembro de 2011, às 14:00 h, na sala de Pós-Graduação (3403) da Faculdade de Odontologia, reuniu-se a Comissão Examinadora, composta pelos professores Dra. Cláudia Silami de Magalhães, Dr. Allyson Nogueira Moreira, Dr. Vagner Rodrigues Santos, Dra. Elizabeth Maria Bastos Lages, Dr. Hercílio Martelli Júnior e Dr. Cássio Vicente Pereira. A Professora Dra. Cláudia Silami de Magalhães, Orientadora da Tese, na qualidade de Presidente da sessão, apresentou a Comissão Examinadora e declarou abertos os trabalhos. A candidata foi dado o tempo de até 50 (cinquenta) minutos para fazer a exposição oral sobre o seu trabalho **"Experiência de cárie dentária e presença de estreptococos do grupo mutans em indivíduos com fissuras lábio-palatinas: estudo transversal controlado"**. Encerrada a exposição, foi iniciada a arguição, dentro do limite de tempo de 30 (trinta) minutos, pelos Professores Dr. Vagner Rodrigues Santos, Dra. Elizabeth Maria Bastos Lages, Dr. Hercílio Martelli Júnior e Dr. Cássio Vicente Pereira, com limite de 30 (trinta) minutos para a resposta. Terminadas as arguições, a Presidente suspendeu os trabalhos por 10 minutos para que os examinadores pudessem decidir pelo resultado a ser dado à candidata. A Comissão Examinadora opta pela APROVAÇÃO da candidata. Para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada por mim, Dra. Cláudia Silami de Magalhães, Presidente e pelos demais membros desta comissão examinadora. Belo Horizonte, 23 de setembro de 2011.

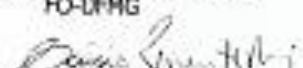
  
Dra. Cláudia Silami de Magalhães  
FO-UFMG - Orientadora

  
Dr. Vagner Rodrigues Santos  
FO-UFMG

  
Dr. Hercílio Martelli Júnior  
UNIMONTES

  
Dr. Allyson Nogueira Moreira  
FO-UFMG - Co-Orientador

  
Dra. Elizabeth Maria Bastos Lages  
FO-UFMG

  
Dr. Cássio Vicente Pereira  
UNILAVRAS

## *Dedicatoria*

---

Dedico este trabalho à minha filha **Leticia**, pois ele só foi possível graças a incontáveis horas sem sua presença, sem o convívio... sem você.

**Te amo mais do que tudo.**

**Você é minha vida.**

## *Agradecimentos*

---

Agradeço primeiramente a **Deus** por sua bondade e por iluminar meu caminho rumo à felicidade e à realização de mais um sonho.

Agradeço à minha **Mãe Lucília**.

Não tenho palavra para dizer o quanto a senhora é importante em minha vida. Exemplo de mulher forte, trabalhadora, humilde, persistente, MÃE e esposa. Você faz os sonhos acontecerem e a realidade ser mais doce.

Aos meus irmãos **Pollyana, Germano e Carolina**, e ao meu cunhado **Cristiano** por me apoiarem... sonharem comigo meus sonhos. Sinto muito a falta de vocês. Sinto muito orgulho de ser dessa família!!!

À minha avozinha **Maroca** agradeço pelas inúmeras orações e pelo orgulho que vai sentir de ter uma neta Doutora (...se Deus quiser).

**Amo vocês.**

## *Agradecimentos*

---

Aos meus sogros **Donda** (Prof. Fiorini) e D. **Neném** (Maria Luiza) agradeço pelo apoio, dedicação e oportunidade. Agradeço por muitas vezes fazerem o meu papel junto à Letícia. Vocês são verdadeiramente especiais.

Aos meus cunhados **Celso, James, Hellen, Claudia** e aos meus sobrinhos **Júlia, Gustavo, Felipe e Rafaela** agradeço o carinho, dedicação e paciência. Com vocês, sinto-me em casa.



## *Agradecimentos*

---

Agradeço à **Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS** – na pessoa da Reitora Maria do Rosário Araújo Vellano e do Gestor de Pesquisa e Pós-Graduação Mário Sérgio de Oliveira Swerts, pelos anos de oportunidade e confiança. Agradeço também pela estrutura oferecida para o desenvolvimento deste estudo.

Agradeço aos Professores **José Ronaldo Miranda (Gueti)**, **Leandro Carnevalli Franco de Carvalho** e todos os **demais professores**, e à **Sueli e demais funcionários do Curso de Odontologia da UNIFENAS** pela convivência, carinho e paciência. Com vocês aprendo a cada dia o sentido de equipe, dedicação e trabalho.

Ao **Centro Pró-Sorriso da UNIFENAS**, em especial ao Professor **Julian Orsi** e aos funcionários **Elza, Admilson e Darlei**, agradeço pela oportunidade de trabalhar com vocês, desenvolver meu estudo, e conviver neste ambiente maravilhoso cujo único objetivo é ajudar o próximo.

Agradeço aos Professores e Funcionários **do Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismo e Laboratório de Genética** da UNIFENAS pela dedicação e oportunidade. Ao **Prof. Dr. Marcelo Fabiano Boriollo**, à **Luciana Rufino**, à **Lucimara** meus sinceros agradecimentos.

Agradeço especialmente à **Bianca Souza Moreira** pelo apoio e companheirismo. Sem sua ajuda não conseguiria terminar a parte experimental do estudo a tempo.

## *Agradecimentos*

---

Agradeço à **Universidade Federal de Minas Gerais**, na pessoa de seu Reitor, Clélio Campolina Diniz, e à **Faculdade de Odontologia da UFMG**, em nome de seu Diretor, Prof. Dr. Evandro Neves Abdo pela oportunidade.

Agradeço ao **Colegiado de Pós Graduação em Odontologia**, ao Prof. Dr. Saul Martins de Paiva, demais professores e funcionários, pelo trabalho e dedicação ao programa.

Ao **Prof. Dr. Allyson Nogueira Moreira** pelo incentivo, confiança e respeito que teve por mim desde minha chegada. Obrigada pela orientação e pela possibilidade de trabalhar com uma pessoa tão querida e capaz.

Agradeço também aos meus colegas de programa de Pós-Graduação pela oportunidade da convivência e troca de experiências. Principalmente à **Fabi** pela confiança e possibilidade de participar de seu trabalho; e à **Audrey** pelas dicas de estatística e pela convivência, afinal entramos juntas no programa.

Agradeço de coração à minha amiga **Carolina Dolabela Leal de Castro** pelo carinho e confiança. Espero que nosso companheirismo e amizade perdurem.

Agradeço aos colegas e alunos do **Curso de Odontologia da FEAD** pela convivência e apoio, principalmente aos meus orientados, que muitas vezes deixei desorientados por causa de meus afazeres.

## *Agradecimentos*

---

Agradeço às Professoras **Dra. Elizabeth Lages** e **Dra. Raquel Conceição Ferreira** pelas correções, dicas e sugestões feitas ao trabalho na qualificação.

Agradeço ao **Professor Vinícius Vieira Vignoli** pela revisão do texto em inglês. Agradeço, não só por este, mas por todos os trabalhos que me ajudou sempre com maior paciência e carinho.

Agradeço ao **Prof. Dr. Mauro Henrique Nogueira Guimarães** pela dicas de estatística. Você é um exemplo de conduta e responsabilidade.

## *Agradecimentos especiais*

---

Ao meu marido **Ricardo**, agradeço o apoio e a compreensão, por todas as vezes em que estive ausente.

Nossos últimos anos podem ser contados em quilômetros rodados.

Esses 11 anos em que estamos juntos me fizeram ter certeza que a Felicidade está nas pequenas coisas, nos pequenos gestos, na simplicidade e na paz.

O sucesso e o reconhecimento é fruto de nossas atitudes e de nossa dedicação.

Sou muito feliz com você.

Agradeço especialmente ao **Professor Dr. João Evagelista Fiorini**, por seu exemplo de mestre e cientista. Sempre pronto para ajudar e questionar. Obrigada por ter me aberto as portas da microbiologia e de sua família.

À minha amiga e co-orientadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Monteiro de Barros**. Sei que quantas vezes eu disser obrigada será pouco, pois dedicação, compreensão e oportunidade não se pode medir e muito menos agradecer. Aprendo com você todos os dias.

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Silami de Magalhães** poucas são as pessoas que podemos chamar de mestre, e você é uma delas. Além de profundo conhecimento técnico-científico, você tem a característica do verdadeiro mestre, a humildade. Muito mais do que a excelente orientação, agradeço, todos os momentos de dedicação, compreensão, carinho e amizade. Agradeço a oportunidade de deixar-me crescer, de pensar com meus pensamentos, de ver com meus olhos e de errar por minhas limitações.

## *Agradecimentos especiais*

---

**Ao meu pai José Aniceto de Freitas**, sei que de onde estiver estará torcendo por mim, pela minha realização pessoal e profissional. Serás sempre meu ídolo maior.

**Eterna saudade.**

*Epígrafe*

---

Pensar é o trabalho mais difícil que existe. Talvez por isso tão poucos se dediquem a ele.

Henry Ford

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Ocorrência de FL/P para cada mil nascidos em estudos realizados no Brasil.	28
Quadro 2: Frequência absoluta das referências encontradas com cada uma das estratégias de busca e das referências eliminadas seguindo os critérios de exclusão.	36
Quadro 3: Grupos de estudo, pareamento e qualidade dos seis estudos incluídos na revisão sistemática de Hasslof & Twetman (2007).	38
Quadro 4: Análise dos estudos elegíveis e determinação do grau de evidência.	39
Quadro 5: Grau de evidência dos estudos incluídos na revisão crítica.	43
Quadro 6: Características diferenciais das espécies de estreptococos do grupo mutans, os sorotipos e a principal fonte de isolamento.	46
Quadro 7: <i>Primers</i> utilizados para identificação <i>S. mutans</i> e de <i>S. sobrinus</i> pela técnica de PCR (OHO <i>et al.</i> , 2000).	59
Table 1: Comparison of subject and control groups regarding oral hygiene habits, contact with fluoride, mother's education level and last visit to the dentist. (Artigo 1)	83
Table 2: Comparison of subject and control groups regarding variables of interest. (Artigo 1)	84
Tabela 1: <i>Primers</i> utilizados para identificação <i>S. mutans</i> e de <i>S. sobrinus</i> pela técnica de PCR (Oho <i>et al.</i> , 2000). (Artigo 2)	98
Tabela 2: Resultado das análises univariadas para cada uma das variáveis dependentes cuja associação apresentou $p < 0,25$ . (Artigo 2)	99
Tabela 3: Resultado da análise multivariada para cada uma das variáveis desfecho. (Artigo 2)	101

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de FL/P – 1. lábio normal, 2. fissura labial unilateral, 3. fissura labial bilateral, 4. lábio e palato normais, 5. fissura lábio-palatina unilateral, 6. fissura lábio-palatina bilateral, 7. fissura palatina.

29



## LISTA DE ABREVIATURAS E NOTAÇÕES

µL: Microlitro

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

AMSB: Ágar Mitis Salivarius Sacarosado com Bacitracina e Telurito de Potássio

AOF: Aparelho ortodôntico fixo

AP-PCR: *Arbitrarily Primed . Polymerase Chain Reaction*

ATCC: *American Type Culture Collection*

BASCD: *British Association for the Study of Community Dentistry*

BHI: Infusão de Cérebro e Coração

ceo: Contagem de dentes decíduos cariados, perdidos por cárie ou obturados

ceos: Contagem de superfícies dentárias decíduas cariadas, perdidas por cárie ou obturadas

CIA: Clorofórmio-álcool isoamílico

CL ± A: *Uni- or bilateral cleft lip involving and not involving the alveolar bone*

CL/P: *Cleft li and/or palate*

CLP: *Uni- or bilateral cleft lip and palate*

cm: Centímetro

CP: *Cleft palate involving the hard and/or soft palate*

CPOD: Contagem de dentes permanentes cariados, perdidos por cárie ou obturados

CPOS: Contagem de superfícies dentárias permanentes cariadas, perdidas por cárie ou obturadas

CTAB: Brometo de cetiltrimetilamônio (*Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*)

DMFS: *Decayed-Missing-filled-surfaces*

DMFT: *Decayed-Missing-filled-Teeth*

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA: Ácido etileno diamino tetracético (*Ethylenediaminetetracetate*)

EUA: Estados Unidos da América

FL/P: Fissura labial e/ou palatina

FL: Fissura labial

FLA: Fissura labial com envolvimento do osso alveolar

FLP: Fissura lábio-palatina

FP: Fissura palatina

GI: Glucanos insolúveis

GTF: Glicosiltransferases

*gtfB*: Gene  $\beta$ -glicosiltransferase

h: Hora

HDI: *Human Development Index*

IC: Intervalo de confiança

ICDAS: *International Caries Detection and Assessment System*

IDH: Índice de Desenvolvimento Humano

IPV: Índice de placa visível

INS: Índice de Necessidade em Saúde - Fundação João Pinheiro

kb: Quilo base

M: Molar

min: Minutos

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mM: Milimolar

MNI: *Medical Necessity Index*

N: Normal

OMS: Organização Mundial da Saúde

OR: *Odds ratio*

pb: Pares de base

PCR: *Polimerase Chain Reaction*

pmol: Picomol

qPCR: *Quantitative real time PCR*

rpm: Rotações por minuto

TBE: Tris-Borato-EDTA

TE: 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UNIFENAS: Universidade José do Rosário Vellano

WHO: *World Health Organization*

ng: Nanograma

## RESUMO

Este estudo transversal controlado comparou a experiência de cárie e a presença de estreptococos do grupo mutans em adolescentes e adultos jovens com fissura labial e/ou palatina (FL/P) com um grupo controle sem fissura. Verificou também a associação entre experiência de cárie dentária e variáveis biológicas e ambientais relacionadas à doença. Foram incluídos 30 pacientes com FL/P (grupo caso) e 30 sem FL/P (grupo controle), com idade entre 12 e 21 anos, pareados por gênero, idade, condições de vida e utilização de dispositivo ortodôntico. Foram coletadas informações sobre: renda familiar *per capita*, contato com fluoretos, hábitos de higiene, acesso ao tratamento odontológico, escolaridade materna e contato com sacarose. No exame clínico foram registrados os índices de placa visível, de sangramento gengival, CPOD e CPOS, e as superfícies com lesões ativas de cárie. Foi coletado biofilme supra-gengival a partir do qual foram realizados procedimentos para isolamento e identificação por PCR de *S. mutans* e de *S. Sobrinus*. Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico SPSS Statistics Data Editor 17.0, com nível de significância de 5%. Os dados clínicos foram analisados pelo teste de McNemar para comparar as variáveis qualitativas dicotômicas, pelo teste t pareado para as variáveis quantitativas com distribuição normal e pelo teste de Wilcoxon para as quantitativas com distribuição não-normal. Realizou-se comparação entre os grupos para a prevalência dos estreptococos do grupo mutans. A associação entre a experiência de cárie, e as variáveis independentes foi verificada por análise multivariada por regressão logística *backward stepwise conditional*. Não houve diferença significativa entre os grupos caso e controle para higiene bucal e contato com fluoretos. Os grupos diferiram significativamente quanto às variáveis: renda *per capita* ( $p=0,007$ ), presença de cárie ativa ( $p=0,024$ ), componente cariado do CPOS ( $p=0,040$ ), índice de placa visível ( $p=0,000$ ) e sangramento gengival ( $p=0,002$ ). Foi observada presença de *S. mutans* em 83,34% das amostras de biofilme do grupo caso e em 86,67% das do grupo controle; o *S. sobrinus* estava presente em 6,66% das amostras de biofilme do grupo caso e em 10% do grupo controle. Não houve associação entre a presença de *S. mutans* ou de *S. sobrinus* e experiência de cárie. A presença de FL/P mostrou-se associada à cárie apenas quando esta foi medida pelo CPOS. O uso de aparelho ortodôntico mostrou associação positiva com o CPOD, CPOS, componente restaurado do CPOD e CPOS. Os indivíduos com FL/P mostraram maior experiência de cárie que os sem FL/P. Dentre os fatores estudados que podem interferir no processo da doença, os fatores

ambientais mostraram-se mais importantes que os fatores biológicos na determinação da experiência de cárie.

Palavras-chave: cárie, CPOD, PCR, *S. mutans*, *S. sobrinus*, fissura lábio-palatal

## ABSTRACT

Dental caries experience and presence of mutans streptococci in subjects with cleft lip and palate: controlled cross-sectional study

This controlled cross-sectional study aimed to compare the caries experience and presence of mutans streptococci in adolescents and young adults with cleft lip and / or palate (CL/P) with a control group without clefts. The association between dental caries experience and biological and environmental factors was also assessed. The study included 30 patients with CL/P (case group) and 30 without CL/P (control group), aged between 12 and 21 years, matched by gender, age, living conditions and use of orthodontic device. Data of family income, contact with fluorides, hygiene, access to dental care, maternal education and contact with sucrose were collected. Visible plaque index, gingival bleeding, DMFT and DMFS, and surfaces with active caries lesions were recorded. Microorganisms were isolated from the biofilm collected to identification of *S. mutans* and *S. Sobrinus* by PCR. The data were analyzed using the statistical program SPSS 17.0 Data Editor, with a significance level of 5%. The clinical data were analyzed by the McNemar test to compare dichotomous qualitative variables or by the paired t test for quantitative variables with normal distribution or the Wilcoxon test for quantitative variables with non-normal distribution. The groups were compared for the prevalence of mutans streptococci. Backward stepwise conditional logistic regression test the association between caries experience and independent variables. There was no significant difference between case and control groups for oral hygiene and contact with fluoride. The groups differed significantly with respect to variables: *per capita* income ( $p = 0.007$ ), surfaces with active caries ( $p = 0.024$ ), the decay component of the DMFS index ( $p = 0.040$ ), visible plaque index ( $p = 0.000$ ) and gingival bleeding ( $p = 0.002$ ). *S. mutans* was observed in 83.34% of the biofilm samples in the case group and 86.67% of the control group; *S. sobrinus* was present in 6.66% of the biofilm samples in the case group and 10% in the control group. There was no association between the presence of *S. mutans* or *S. sobrinus* and caries. The presence of CL/P was associated with caries only when it was measured by DMFS. The use of orthodontic apparatus was positively associated with the DMFT, DMFS, the filled components of DMFT and DMFS. Subjects with CL/P showed a higher caries experience than those without CL/P. Among the studied factors that may

influence the caries process, environmental factors were more important than biological factors in determining disease.

Keywords: dental caries, DMFT, PCR, *S. mutans*, *S. sobrinus*, cleft lip and palate



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1 As Fissuras Lábio-Palatinas	27
2.2 Cárie dentária em indivíduos com FL/P	30
2.2.1 Revisão Crítica da Literatura	35
2.3 Microrganismos relacionados à cárie em pacientes com FL/P	43
2.4 Os estreptococos do grupo mutans e os estudos biomoleculares	45
3 OBJETIVOS	51
4 METODOLOGIA	53
4.1 Delineamento do estudo e seleção dos indivíduos	54
4.2 Pareamento	55
4.3 Coleta de dados	55
4.3.1 Coleta de biofilme	56
4.3.2 Exame clínico	57
4.4 Reprodutibilidade	57
4.5 Isolamento dos microrganismos	57
4.6 Identificação por PCR	58
4.6.1 Extração do DNA bacteriano	58
4.6.2 PCR	59
4.6.3 Análise por eletroforese	60
4.7 Análise estatística	61
5 RESULTADOS	63
5.1 Artigo 1	65
5.2 Artigo 2	85
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
Referências	105
Anexos	116

# *Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

As anomalias congênitas afetam, no mundo, cerca de 5% dos nascidos vivos; na América Latina respondem por 10-25% das admissões hospitalares pediátricas e ocupam entre o terceiro e quarto lugares dentre as causas de morte no primeiro ano de vida; no Brasil são a segunda causa de mortes perinatais, tendo contribuído com 13% destas no ano 2000 (MONLLEÓ; GIL-DA-SILVA-LOPES, 2006).

Dentre os defeitos congênitos, as anomalias crânio-faciais, que são aquelas em que o arcabouço craniano e/ou o facial apresentam alterações de contorno, constituem um grupo diverso e complexo e podem apresentar-se isoladas ou múltiplas, de etiologia genética e/ou ambiental (WHO, 2002).

As fissuras lábio-palatinas (FL/P) são más-formações congênitas que acometem o terço médio da face, apresentando graus variados de gravidade. Seu tratamento inicia-se ao nascimento e perdura até pelo menos o fim do crescimento do indivíduo, exigindo uma equipe multidisciplinar que envolve Medicina, Odontologia, Fonoaudiologia, Fisioterapia, Nutrição e Psicologia, e tem por objetivo promover a reabilitação e reintegração social do paciente (ALVES *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2007a).

Estudos têm relatado a ocorrência de 0,19 a 1,50 casos de FL/P para cada 1.000 nascidos vivos em diferentes regiões do Brasil (ARCE *et al.*, 1968; NAGEM-FILHO *et al.*, 1968; LOFFREDO *et al.*, 2001; MARTELLI-JUNIOR *et al.*, 2006; NUNES *et al.*, 2007). Uma estimativa sugere a existência de aproximadamente 180 mil pessoas com FL/P no país.

Estudos em diferentes populações indicam que indivíduos com FL/P parecem apresentar mais lesões de cárie do que aqueles sem FL/P (DAHLLÖF *et al.*, 1989; BESSELING; DUBOIS, 2004; KIRCHBERG *et al.*, 2004; AL-WAHADNI *et al.*, 2005; HASSLOF; TWETMAN, 2007; CHENG *et al.*, 2007b; STEC-SLONICZ *et al.*, 2007; MUTARAI *et al.*, 2008). No entanto, outros estudos observaram que a condição dentária e periodontal, e os riscos a estas doenças, de indivíduos com FL/P é semelhante aos da população geral (LAGES *et al.*, 2004; HASSLOF; TWETMAN, 2007; CHENG, *et al.*, 2007a).

Alterações anátomo-fisiológicas como o mau posicionamento dentário, o desvio do septo nasal ou a estenose narinária, provocando respiração bucal, somadas àquelas alterações resultantes das intervenções terapêuticas reabilitadoras, como fístulas ou fibroses cicatriciais oriundas do reparo cirúrgico, e a utilização de aparelhos ortodônticos e/ou de próteses

odontológicas, favorecem a colonização da cavidade bucal por microrganismos e o maior acúmulo de biofilme dental (DAHLLÖF *et al.*, 1989; BOKHOUT *et al.*, 1996; CHENG *et al.*, 2007b).

Além disso, existe uma tendência de ingestão de alimentos de consistência mais macia durante o tratamento reabilitador cirúrgico e ortodôntico do paciente com FL/P, induzindo à estagnação de alimentos em regiões de cicatrizes e fístulas, favorecendo a formação do biofilme e aumentando, conseqüentemente, o risco de cárie (CHENG *et al.*, 2007a).

A cárie é uma doença induzida por biofilme, causada pela perda do equilíbrio na fisiologia entre o mineral do dente e o fluido do biofilme (FEJERSKOV; NYVAD, 2003). É uma doença onipresente em todas as populações mas a taxa de incidência varia muito dentro e entre populações (FEJERSKOV; BAELUM, 1998). Tendo em vista o caráter complexo da doença, numerosos fatores biológicos, como saliva, hábitos alimentares, composição do biofilme, higiene bucal entre outros, podem influenciar seu resultado. Nos níveis individual e populacional muitas destas variáveis são influenciadas pelas condições comportamentais e sócio-econômicas (FEJERSKOV, 2004).

A complexidade da microbiota presente no biofilme dental dificulta a determinação de um agente bacteriano único na etiologia da cárie (FEJERSKOV, 2004). No entanto, microrganismos Gram-positivos acidogênicos, acidúricos e com capacidade de aderência às superfícies dentárias, pertencentes aos estreptococos do grupo mutans, estão envolvidos neste processo (LOESCHE, 1986; NAPIMOGA *et al.*, 2004; PALMER *et al.*, 2010). Dentre as espécies, o *Streptococcus mutans* e o *Streptococcus sobrinus* são isolados com frequência da placa dental e estão fortemente associados à cárie (SEOW, 1998).

Estudos têm relatado a ocorrência de *S. mutans* e *S. sobrinus* na cavidade bucal humana, sendo que a frequência de isolamento de *S. mutans* no biofilme dental é maior do que a de *S. sobrinus* (LOESCHE, 1986; NAPIMOGA *et al.*, 2004; PALMER *et al.*, 2010). Indivíduos colonizados por *S. mutans* e *S. sobrinus* tendem a apresentar maior prevalência de cárie (KÖHLER *et al.*, 1988; NURELHUDA *et al.*, 2010) e maior severidade da doença (PALMER *et al.*, 2010) que aqueles colonizados apenas por *S. mutans*.

Estudos sobre a experiência de cárie e a presença de estreptococos do grupo mutans em adolescentes e adultos jovens com FP/L são escassos e os existentes são considerados de fraca evidência científica (HASSLOF; TWETMAN, 2007). Portanto, o objetivo deste estudo foi comparar a experiência de cárie de indivíduos com FL/P e a presença de *S. mutans* e *S. sobrinus*, com um grupo controle sem fissura, testando a hipótese nula que a experiência de

cárie e a presença de espécies cariogênicas no biofilme dental de indivíduos com FL/P é similar à dos controles sem FL/P.

*Revisão da literatura*

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 As Fissuras Lábio-Palatinas

As anomalias congênitas afetam cerca de 5% dos nascidos vivos em todo o mundo. No Brasil, os defeitos congênitos são a segunda causa de morte perinatal (VICTORA; BARROS, 2001; MONLLEÓ; GIL-DA-SILVA-LOPES, 2006). Dentre os defeitos congênitos, as anomalias crânio-faciais constituem um grupo diverso e complexo. A denominação genérica de anomalias crânio-faciais inclui anomalias isoladas e múltiplas, de etiologia genética e/ou ambiental. Via de regra, refere-se à situação em que o arcabouço craniano e/ou facial apresentam alterações de contorno (WHO, 2002).

As fissuras orofaciais representam algumas dessas anomalias congênitas mais comuns, podendo ser encontradas isoladamente ou em associação com determinadas síndromes. Dentro do grupo das fissuras orofaciais estão incluídas as fissuras labiais e/ou palatinas, que são deformidades caracterizadas pela interrupção na continuidade dos tecidos do lábio superior, rebordo alveolar superior e/ou palato, e constituem as anomalias congênitas crânio-faciais mais prevalentes, respondendo por 65% de todas as anomalias de cabeça e pescoço (FOGH-ANDERSEN, 1942). Em várias partes do mundo, a ocorrência de FL/P é maior que a frequência de defeitos do tubo neural ou da síndrome de Down (OPCS, 1995). Estas alterações podem acometer até um a cada 600 recém-nascidos, o que significa o nascimento de um indivíduo com FL/P a cada 2,5 minutos (MOSSEY; LITTLE, 2002).

As FL/P são más-formações congênitas do terço médio da face que apresentam graus variáveis de gravidade e cujo tratamento é um processo que tem início ao nascimento e continua até a idade adulta, envolvendo uma equipe multidisciplinar, de modo a promover a reabilitação e reintegração social do paciente (ALVES *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2007a). Embora as fissuras orofaciais sejam uma das más-formações congênitas mais frequentes e tenham sido descritas pela primeira vez há dois séculos, sua etiologia não se encontra claramente estabelecida, sendo possivelmente multifatorial, em que fatores genéticos e ambientais podem atuar isoladamente ou em associação (FREITAS, 1998).

Considerando os aspectos epidemiológicos das FL/P, estudos foram realizados tanto no âmbito nacional como internacional. A ocorrência de FL/P no Brasil foi observada em vários estudos listados no Quadro 1. Uma estimativa sugere a existência, no Brasil, de aproximadamente 180 mil pacientes com FL/P (ALVES *et al.*, 2004).

Quadro 1: Ocorrência de FL/P para cada mil nascidos em estudos realizados no Brasil.

Referência	Ocorrência de fissuras	Local do estudo
Nagem-Filho <i>et al.</i> , 1968	1,54	Bauru, SP
Arce <i>et al.</i> , 1968	0,82	Regiões urbanas e rurais do sul de Minas Gerais
Loffredo; Freitas; Grigolli, 2001	0,19	Regiões brasileiras
Cunha <i>et al.</i> , 2004	0,78	Pelotas, RS
Guimarães, 2004	0,77	Belo Horizonte, MG
Martelli-Júnior <i>et al.</i> , 2006	1,46	Alfenas, MG
Nunes <i>et al.</i> , 2007	1,35	Campos dos Goytacazes, RJ

Estudos epidemiológicos das FL/P não sindrômicas, realizados ao redor do mundo, frequentemente têm obtido resultados variáveis quanto à prevalência dessas alterações (MITCHELL *et al.*, 2002), o que, em parte, pode ser explicado por diferenças étnicas, culturais e geográficas entre as populações, além da disponibilidade de dados epidemiológicos. É reportada incidência de 1,56 bebês com fissura para cada 1000 vivos na Tailândia (RITTHAKOL, 2001), de 2 na Suécia (HAGBERG *et al.*, 1998), 0,18 na China (QIU, 2002) e 0,18 na Austrália (VALLINO-NAPOLI *et al.*, 2004).

Aproximadamente, 20 crianças nascem diariamente nos Estados Unidos com algum tipo de fissura orofacial, resultando em 7.500 casos anuais. Cada uma dessas crianças requer diversos procedimentos cirúrgicos e tratamento multiprofissional complexo, envolvendo inclusive abordagem em nível familiar (TOLAROVÁ; CERVENKA, 1998).

As FL/P ocorrem devido à falta de fusão do lábio e/ou palato, ainda na vida intra-uterina, onde a formação da face representa um dos mais complexos eventos do desenvolvimento embrionário. A falta ou a insuficiente fusão dos processos nasais medianos com os processos maxilares resulta na interrupção do desenvolvimento do lábio superior, provocando a fissura labial e/ou a falta de fechamento na linha média das placas palatinas, origina a fissura de palato (LOFFREDO *et al.*, 2001). De uma maneira geral as FL/P causam importantes alterações funcionais e estéticas.

Em função das diferentes apresentações clínicas das FL/P, existem diversos critérios de classificação. A partir das classificações de Davis & Ritche (1922) e Veau (1971), surgiram



inúmeras outras classificações, destacando-se as de Spina e colaboradores (1972) e Spina (1973), que possuem como referência anatômica o forame incisivo. Esta classificação, dividida em quatro diferentes grupos e muito utilizada no Brasil, mostra-se simples e prática para equipes multiprofissionais.

As fissuras orofaciais podem ser classificadas em 4 grandes grupos, de acordo com as estruturas anatômicas que atingem: fissura pré-forame incisivo (correspondem às fissuras labiais, com e sem envolvimento do osso alveolar, uni ou bilaterais); fissura pós-forame incisivo (correspondem às fissuras palatinas); fissura transforame incisivo (correspondem às fissuras que envolvem lábio, osso alveolar e palato, uni ou bilaterais) e as fissuras raras da face (outros tipos menos frequentes de fissuras) (SPINA *et al.*, 1972).

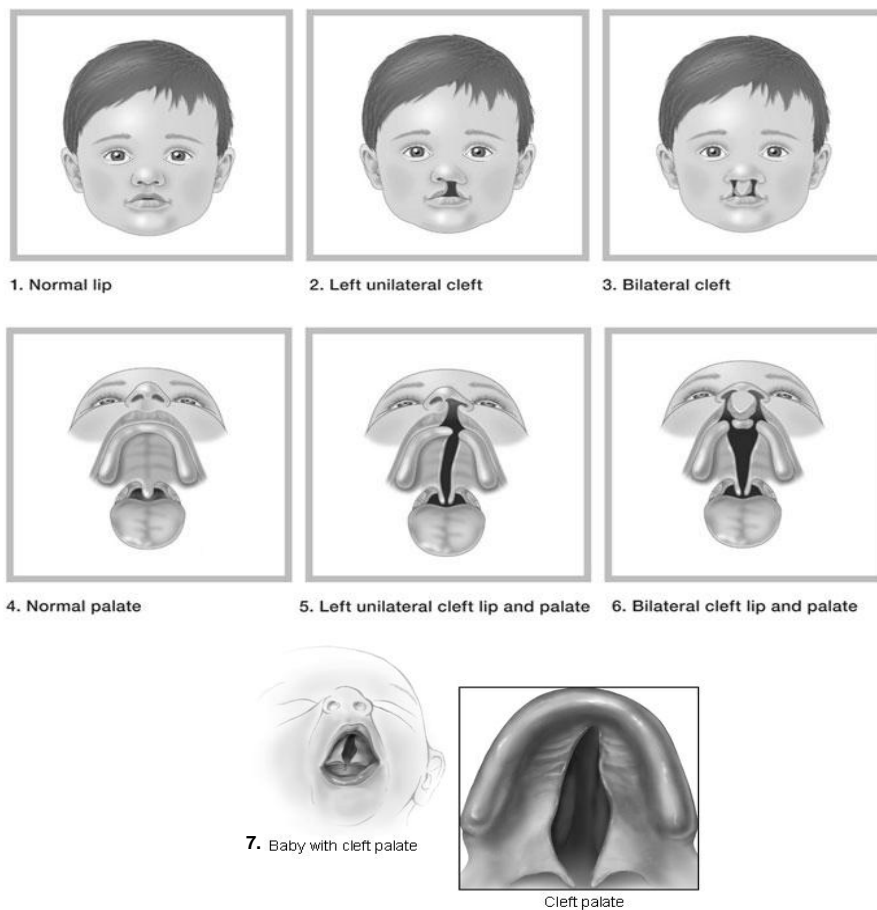


Figura 1: Tipos de FL/P – 1. lábio normal, 2. fissura labial unilateral, 3. fissura labial bilateral, 4. lábio e palato normais, 5. fissura lábio-palatina unilateral, 6. fissura lábio-palatina bilateral, 7. fissura palatina. Adaptado de [http://www.rch.org.au/kidsinfo/factsheets.cfm?doc\\_id=7759](http://www.rch.org.au/kidsinfo/factsheets.cfm?doc_id=7759)

Com relação aos tipos de fissuras, tem-se verificado maior ocorrência das fissuras lábio-palatinas (FLP), em relação à fissura labial (FL) e fissura palatina (FP) isoladas (BARBOSA *et*

*al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2004). Em uma população de 126 crianças com FL/P, não sindrômicas, no sul do estado de Minas Gerais, foi observado que as FLP completas e unilaterais (26,19%) são as anomalias de maior prevalência, seguidas por FL incompletas e unilaterais (23,81%) (MARTELLI JUNIOR *et al.*, 2007).

## **2.2 Cárie dentária em indivíduos com FL/P**

A cárie dentária é uma doença multifatorial, induzida pelo biofilme. Dependendo das condições do meio bucal, o equilíbrio fisiológico entre dente e biofilme é rompido, resultando em perda de minerais. As lesões de cárie se desenvolvem em locais que permitem o acúmulo do biofilme por tempo prolongado, como superfícies oclusais (especialmente durante o período de erupção), superfícies proximais abaixo do ponto de contato, e superfícies lisas, ao longo da margem gengival. Iniciam-se no esmalte, podendo afetar toda a estrutura dentária incluindo dentina e cemento radicular, e tem progressão raramente autolimitante, na ausência de tratamento. Se a lesão atinge o estágio de cavitação, este sítio representa um nicho ecológico com pH baixo, ao qual a composição do biofilme se adapta, gradualmente (BAELUM; FEJERSKOV, 2005).

O conceito da doença cárie como de natureza infecciosa, de origem bacteriana foi introduzido por Keys no início da década de 1960. No estudo daquele autor, a doença apenas se desenvolvia em roedores que entravam em contato ou comiam as fezes de outros roedores com cárie em atividade. Mais tarde, foi identificado o *Streptococcus mutans*, como bactéria responsável por tal transmissão (BEIGHTON, 2005).

Antes mesmo dos estudos de Keys (1960) as pesquisas microbiológicas em torno da doença focavam na presença e desenvolvimento de *Lactobacillus* em lesões cavitadas demonstrando também a preocupação em provar a patogenicidade de microrganismos que fossem capazes de fermentar carboidratos, produzindo ácidos que por sua vez promoveriam a desmineralização da estrutura dentária (FEJERSKOV, 2004).

O conceito de cárie como doença infecciosa hoje é discutível partindo-se da complexidade dos fenômenos associados, da compreensão de que as bactérias responsáveis pela fermentação de açúcares são endógenas e de que nenhuma mudança nos níveis de *Streptococcus mutans* ocorreu com o declínio na experiência de cárie nas populações (FEJERSKOV, 2004).

Atualmente tem sido proposta a hipótese da placa ecológica para explicar o papel dos microrganismos na etiologia da cárie dentária. A hipótese é a de que microrganismos associados à doença estão presentes em locais saudáveis, em baixos níveis e quando alterações nas condições locais provocam desequilíbrio da microbiota residente, o crescimento de espécies acidogênicas e acidúricas, favorecem a desmineralização. Numerosos fatores, como quantidade e qualidade da saliva, hábitos alimentares, hábitos de higiene bucal entre outros, podem influenciar o equilíbrio entre o dente e o biofilme e como consequência, influenciar o resultado da doença. Os fatores biológicos relacionados à cárie dentária são altamente influenciados pelas condições comportamentais e sócio-econômicas (FEJERSKOV, 2004).

No Brasil, pessoas com a incidência aumentada da doença e que geralmente não têm acesso ao flúor ou a programas preventivos de saúde bucal, num ambiente de baixo nível educacional, constituem os chamados grupos de alto risco, que concentram altos níveis de cárie dentária, polarizando a distribuição da doença (CARDOSO *et al.*, 2003; PERES *et al.*, 2003).

Estudos em diferentes populações indicam que crianças com FL/P parecem apresentar mais lesões de cárie do que aquelas que não têm fissura (JOHNSEN ; DIXON, 1984; DAHLÖF *et al.*, 1989; BESSELING ; DUBOIS, 2004; KIRCHBERG *et al.*, 2004; AL-WAHADNI *et al.*, 2005; MUTARAI *et al.*, 2008).

São listados como possíveis fatores relacionados à maior prevalência de cárie em indivíduos com FL/P:

- maior atenção dada à correção cirúrgica da fissura que à prevenção e tratamento precoce da cárie (AL-DAJANI, 2009);
- boca seca causada por hábitos de respiração bucal; auto limpeza deficiente dos dentes; diferença nos hábitos de dieta durante tratamento (BESSELING; DUBOIS, 2004);
- aumento do tempo de permanência dos alimentos na boca (AHLUWALIA *et al.*, 2004);
- maior número de bactérias cariogênicas na cavidade bucal (AHLUWALIA *et al.*, 2004);
- anomalias de forma, número e posição dentária (WONG; KING, 1998; RUIZ *et al.*, 1999);

- controle mecânico da placa dificultado pela anatomia da região da fissura; cicatrizes e paralisia labial decorrentes da correção cirúrgica (DAHLLÖF *et al.*, 1989; BOKHOUT *et al.*, 1996);
- terapêutica ortodôntica (CHENG *et al.*, 2007a);
- conhecimento restrito dos pais de bebês com FLP sobre higiene bucal (VILELA *et al.*, 1996; ANKOLA *et al.* 2005);
- dieta especial desde os primeiros meses de vida, como preparação pré-operatória para cirurgia corretiva (BOKHOUT *et al.*, 1996; DALBEN *et al.*, 2003; MUTARAI *et al.*, 2008).

O padrão nutricional de crianças com de FL/P apresentou aspectos bastante insalubres, como o desmame materno precoce, devido principalmente à dificuldade de sucção do bebê, e a introdução precoce de alimentos açucarados (DALBEN *et al.*, 2003). A sacarose facilita o aumento de níveis de estreptococos do grupo mutans na placa dental, pois a partir deste carboidrato tais microrganismos sintetizam glucanos que favorecem sua aderência e acúmulo na placa dental (HAMADA; SLADE, 1980; LOESCHE, 1986).

A prevalência de cárie em pacientes com fissuras pode variar de acordo com o tipo de fissura. A saúde bucal de crianças portadoras de fissuras isoladas de lábio ou palato mostra-se melhor que daquelas com fissuras de lábio e palato associadas (PAUL; BRANDT, 1998; ALVES *et al.*, 2004; BESSELING; DUBOIS, 2004; ANKOLA *et al.*, 2005).

Um estudo brasileiro, avaliou cárie e doença periodontal em 78 indivíduos com FL/P entre 1 e 32 anos de idade. O CPOD (ceo) e o CPOS (ceos) foram calculados com base no exame visual e a doença periodontal foi avaliada por parâmetros clínicos clássicos: hiperplasia gengival, sangramento, profundidade à sondagem, perda de inserção, recessão gengival e cálculo. O ceo foi de  $2,91 \pm 3,99$  para crianças entre 1 e 5 anos de idade;  $2,77 \pm 3,15$  para a faixa etária de 6 a 12 anos. O CPOD para os grupos etários de 6 a 12 anos, 13 a 18 anos, e 19 a 32 anos foi de  $1,87 (\pm 1,78)$ ,  $6,46 (\pm 3,11)$  e  $13,62 (\pm 6,51)$ , respectivamente. Um total de 5,3% dos indivíduos apresentaram periodonto saudável, e 86,6% apresentavam gengivite e 8% apresentavam periodontite. Os autores concluíram que a condição dentária e periodontal de indivíduos com fissura lábio-palatina foi semelhante à da população geral da região na qual o estudo foi realizado (Minas Gerais, Brasil). Medidas preventivas devem ser enfatizadas, visando a melhoria da saúde bucal, de forma similar à população em geral (LAGES *et al.*, 2004).

Ainda no Brasil, foi avaliada a prevalência das doenças bucais em crianças entre 02 a 12 anos com FL/P. Foram observadas má-oclusão, doença periodontal, anomalias dentárias,

presença de lesões cáries e ausências dentárias. Os valores médios do ceo por idade foram maiores para crianças com FL/P, mostrando maior risco às alterações bucais. Este fato foi relacionado à má formação facial somada às precárias condições sócio-econômico-culturais (ARMADA *et al.*, 2005).

No sul do Vietnã, 154 crianças com FL/P, com idades entre 4 e 6, 11 e 13, e 14 e 16 anos, foram examinadas em cinco cidades diferentes. O ceo / CPOD foi determinado de acordo com critérios WHO. A média de dentes afetados pela cárie foi de 9,95 para crianças de 4 a 6 anos de idade; 2,97 para crianças de 11 a 13 anos; e de 4,93 para crianças de 14 a 16 anos. Crianças de 4 a 6 anos com FL/P unilateral ou bilateral tiveram significativamente mais lesões de cárie e maior ceo do que crianças da mesma idade, com FL ou FLA. Concluiu-se que crianças com fissuras orais têm um elevado número de dentes afetados pela cárie, e especial atenção será necessária para a sua saúde bucal (BESSELING; DUBOIS, 2004).

Na Alemanha, a prevalência de cárie dentária em 623 crianças com FL/P, com idade entre 6 e 16 anos, foi comparada com a prevalência da doença em 47.646 estudantes de Leipzig. O estudo utilizou os índices ceo e CPOD. A prevalência de cárie foi significativamente maior em crianças com FL/P, tanto na dentição decídua, quanto na dentição permanente. Os resultados realçaram a necessidade de uma abordagem mais intensiva para a prevenção das doenças bucais em indivíduos com FL/P (KIRCHBERG *et al.*, 2004).

A necessidade de tratamento da dentição decídua de crianças com FL/P foi avaliada por meio de um estudo transversal descritivo, na Índia. Foram examinadas 83 crianças de 2 a 5 anos com FL/P (46 meninos e 37 meninas). Um questionário auto-aplicável foi direcionado aos pais para obtenção de dados relacionados ao seu nível de educação e hábitos alimentares das crianças. A maioria das crianças com FL/P exibiam experiência de cárie e exigiam diferentes tipos de tratamento. Os resultados do estudo mostram que: (1) todos os grupos etários de crianças com FL/P tinham experiência de cárie dentária, (2) crianças com FL tiveram menor prevalência de cárie dentária do que crianças com FL/P ou FP ( $p < 0,05$ ), (3) as necessidades de tratamento devido à cárie estiveram mais relacionadas à fissura combinada de lábio e palato que com as fissuras isoladas (ANKOLA *et al.*, 2005).

Na Jordânia, foram determinados os níveis de cárie dentária e doença periodontal em indivíduos com FL/P e comparados com indivíduos controles pareados não fissurados. Foram examinados 32 indivíduos com FL/P e idade entre 10 e 28 anos, e um número similar de indivíduos controle. Foram coletados dados sobre depósitos de biofilme, gengivite, periodontite, cárie dentária. Os pacientes com FL/P apresentaram os indicadores das doenças significativamente maiores que os indivíduos controle. (AL-WAHADNI *et al.*, 2005).

No sul da Tailândia, foi realizado um estudo transversal que comparou o índice de cárie entre crianças com FL/P e sem FL/P (total de 138 crianças), com idades entre de 18 a 36 meses. Todas as crianças foram examinadas utilizando o índice ceo como parâmetro de gravidade. Uma entrevista estruturada foi conduzida entre os cuidadores e, aplicada análise de regressão múltipla. Os resultados demonstraram que crianças com FL/P tiveram maior prevalência de cárie precoce da infância e demonstraram hábitos alimentares mais insalubres do que aquelas sem FL/P. Os cuidadores das crianças com FL/P exibiram comportamento menos salutar com relação à saúde bucal do bebê, em comparação ao grupo de cuidadores das crianças sem FL/P. A análise multivariada mostrou que o consumo do leite adoçado e hábito de consumo noturno e frequente de alimento açucarado foram as variáveis significativamente associadas à cárie dentária. Portanto, foi observado que crianças com FL/P tinham maior experiência de cárie quando comparados com as sem FL/P e o fator mais fortemente associado foi o hábito do consumo noturno de alimento açucarado (MUTARAI *et al.*, 2008).

A experiência de cárie de 53 indivíduos com FL/P foi comparada com aquela exibida por seus irmãos de mesmo gênero, idade (12 a 29 anos) e residência. Foi encontrada associação entre cárie e presença de FL/P (odds ratio = 2.52; IC: 95%= 1.389–4.574;  $p < 0,05$ ). O índice CPOD foi maior em pacientes com FL/P quando comparado ao do grupo controle ( $p < 0,001$ ), independentemente do nível sócio-econômico (AL-DAJANI, 2009).

Na China, 380 pacientes com FL/P e 339 controles sem FL/P, com idade de 3 a 25 anos, foram comparados quanto aos os índices CPOD/ceo e CPOS/ceos, aos hábitos de vida do sujeito e da família, e ao nível sócio-econômico. A prevalência de cárie foi maior em pacientes com FL/P do que no grupo controle ( $p < 0,05$ ), exceto para o grupo com idade de 3 a 5 anos ( $p > 0,05$ ). Quando comparadas apenas as crianças com FL/P, foi observado menor índice CPOD naquelas que já haviam tido a fissura reparada cirurgicamente, do que nas que não tinham ainda sido submetidas à cirurgia reparadora. Quanto ao tipo de fissura, crianças com FLP ou FP, apresentaram maior índice de cárie que as que apresentavam FL ou FLA. Os autores concluíram que a presença de FL/P, o tipo de fissura e o reparo cirúrgico interferem na experiência de cárie do indivíduo (ZHU *et al.*, 2010).

Já foi observado que os resultados dos estudos que buscam relacionar cárie e doença periodontal com a ocorrência de FL/P diferem principalmente quanto às metodologias empregadas. Apesar de alguns estudos considerarem os indivíduos com FL/P como um grupo que apresenta um risco aumentado à cárie e à gengivite, principalmente na região anterior superior da boca, ainda não existem fortes evidências na literatura de que pacientes com FL/P exibem maior risco às doenças bucais infecciosas (LAGES *et al.* 2000).

Numa revisão sistemática, que comparou a prevalência de cárie em crianças com FL/P com a de crianças sem FL/P foi identificada prevalência de cárie significativamente maior em crianças com FL/P (HASSLOF; TWETMAN, 2007). Embora nenhuma conclusão definitiva tenha sido feita, em face à qualidade baixa a moderada dos estudos elegíveis, houve uma clara tendência para maior prevalência de cárie nos dentes decíduos de crianças que têm FL/P.

### **2.2.1 Revisão crítica da literatura**

Uma revisão crítica da literatura foi realizada para responder à seguinte pergunta: “As fissuras lábio-palatinas aumentam o risco de cárie?”

Entre outubro de 2009 e fevereiro de 2011, foi feita uma busca na base de dados Pubmed utilizando os descritores: “Cleft lip”; “Cleft palate”; “Cleft lip palate”; “Caries” and “Permanent teeth”. A estratégia de busca incluiu os descritores isolados ou em associação.

Foram selecionados estudos que obedecessem aos seguintes critérios de inclusão:

- artigos completos de estudos observacionais com pelo menos um grupo de indivíduos FLP;
- revisões sistemáticas sobre o assunto: cárie em indivíduos com FL/P;
- redigidos nos idiomas: inglês, português e espanhol;
- publicados entre 2006 e 2011 (período posterior à revisão sistemática de Hasslof & Twetman, 2007);
- que incluíssem um grupo controle sem fissura ou fizessem comparação com dados epidemiológicos da população local;
- cuja variável desfecho fosse a experiência de cárie dentária, medida pelos índices: CPOD e componentes/ ceo, CPOS e componentes/ ceos, lesões ativas de cárie, ICDAS, BASCD.

O Quadro 2 mostra o número total de referências encontradas e excluídas, e o critério de exclusão utilizado na supressão da referência.

Quadro 2: Frequência absoluta das referências encontradas com cada uma das estratégias de busca e das referências eliminadas seguindo os critérios de exclusão.

Descritores	Total	Critérios de exclusão					
		Idioma	Repetido	Não relacionada ao tema	Publicação secundária / revisão narrativa	Período de publicação	Ausência do grupo controle
Cleft lip palate	10334						
Cleft palate caries	138	41	0	52	2	32	2
Cleft lip caries	113	30	76	7	0	0	0
cleft lip palate caries	112	34	78	0	0	0	0
cleft lip palate caries permanent teeth	16	2	14	0	0	0	0

Seguindo os critérios de inclusão e exclusão foram selecionadas 9 referências, sendo 8 artigos de pesquisas originais e 1 revisão sistemática.

A revisão sistemática incluída (HASSLOF; TWETMAN, 2007) verificou se a presença de FL/P interferia na prevalência de cárie em crianças. Os autores fizeram a busca incluindo o período de 1966 a maio de 2006 e utilizaram os descritores: 'cleft lip and or palate', 'dental caries', 'craniofacial disorders' and 'dental health'; e excluíram livros, artigos de revisão, dissertações, resumos e relatos de caso. Foram incluídos artigos originais de estudos clínicos avaliando prevalência de cárie em crianças de 0-16 anos; com publicações em inglês, alemão, sueco, dinamarquês ou norueguês; estudos transversais, caso-controle, com os controles sem FL/P, pareados por, pelo menos, sexo e idade e cuja variável desfecho fosse experiência de cárie avaliada e pontuada por critérios definidos.



O Quadro 3, adaptado de Hasslof & Twetman (2007), mostra as referências incluídas naquela revisão, o país em que foram realizados os estudos, a idade e número de indivíduos incluídos, os critérios de pareamento, a inclusão dos indivíduos em programas de prevenção de cárie e o grau de evidência de cada estudo. Os autores analisaram o critério de avaliação da variável desfecho, a utilização de radiografias no diagnóstico da cárie, se era informado teste de reprodutibilidade e *odds ratio*, e se a avaliação era feita em dentes decíduos ou permanentes. Foi observado que em 2 de 4 estudos com dentição permanente e em 3 de 4 estudos com dentes decíduos a prevalência de cárie foi maior em crianças com FL/P. Concluiu-se que havia clara tendência para maior prevalência de cárie nos dentes decíduos de crianças que têm FLP apesar da qualidade baixa a moderada dos estudos elegíveis.

Os artigos originais incluídos na revisão crítica foram analisados seguindo os mesmos critérios definidos por Hasslof & Twetman (2007):

- alto grau de evidência “A”: se apresentasse pareamento por idade, gênero, etnia e condição sócio-econômica; exame clínico e radiográfico; mais de um examinador; teste de reprodutibilidade inter e intra –examinador.
- moderado grau de evidência “B”: se descrevesse pareamento por sexo e idade; radiografia ou teste de reprodutibilidade.
- baixo grau de evidência científica “C”: os demais estudos.

O Quadro 4 mostra o resultado da análise dos estudos incluídos nesta revisão crítica. Estão descritos: o número de sujeitos nos grupos de estudo, a variável desfecho e o critério de avaliação, os critérios de pareamento, o número de avaliadores e se foi realizado teste de reprodutibilidade, os principais resultados e o grau de evidência segundo os critérios definidos.

Quadro 3: Grupos de estudo, pareamento e qualidade dos seis estudos incluídos na revisão sistemática de Hasslof &amp; Twetman (2007)

Primeiro autor, ano publicação	País	Idade	Outras síndromes	FL/P / Controle (n)	Rx/ Teste Kappa	Pareamento	Cuidados para prevenção de cárie	Grau de evidência
Al-Wahadni, 2005	Jordânia	10-15 anos	Não	13/ 13	Não/ Kappa = 0,92	Idade	?	C
Bokhout, 1996	Holanda	2,5 anos	Não	76/ 75	Não/ Não	Idade, área de nascimento	?	C
Dahlöf, 1989;	Suécia	5-6 anos	Sim	49/ 49	Sim/ Não	Idade, gênero	Sim	B
Hewson, 2001	Irlanda	1,5 -16 anos	Sim	90/ 100	Não/ Kappa > 0,75	Clínica de tratamento, idade, sexo, região	?	B
Lauterstein, 1963	EUA	6,5-10,5 anos	?	285/ 300	Sim/ Não	Prática pediátrica	Água fluoretada	C
Lucas, 2000	Inglaterra	3-15 anos	?	60/ 60	Não/ Kappa = 0,95	Clínica de tratamento, idade, sexo, etnia, classe social	Sim	B

Quadro 4: Análise dos estudos elegíveis e determinação do grau de evidência.

Referência	Caso / controle (n)	Desfecho / Critério de avaliação	Pareamento	No. Avaliadores / Reprodutibilidade	Resultado	Grau de evidência
Hazza'a <i>et al.</i> , 2011	98 / 98	Cárie / CPOD – ceo / WHO	gênero idade (4 a 23 anos 4-8 anos 8-12 anos > 12 anos	1 / sim	Mais cárie em indivíduos com FLP bilateral que FLP unilateral. Mais cárie e pior higiene em indivíduos com FLP que nos controles em decíduos e permanentes ( $p < 0,05$ ). OR=?	B
Britton & Welbury, 2010	209 / dados nacionais	Cárie / ceo - ceos / BASCD – Pitts <i>et al.</i> , 1997	idade (6 meses a 6 anos)	2 / sim	Aos 4,5 anos as crianças FLP tem significativamente mais cárie que seus pares não-fissurados.	C

## Cont. Quadro 4

Referência	Caso / controle (n)	Desfecho / Critério de avaliação	Pareamento	No. Avaliadores / Reprodutibilidade	Resultado	Grau de evidência
Zhu <i>et al.</i> , 2010	380 / 339	Cárie / CPOD – ceo / WHO	idade (3 a 25 anos) 3-5 anos 6-12 anos 13-25 anos gênero raça frequência de consumo de alimentos cariogênicos frequência escovação status sócio-econômico	1 / sim	Prevalência de cárie (ceo / CPOD e ceos / CPOS) significativamente maior em indivíduos FP, quando comparado com o grupo controle sem fissura ( $p < 0,05$ ), com exceção para crianças com idade de 3-5 anos ( $p > 0,05$ ). OR=?	B
Al-Dajani, 2009	53 / 53 irmãos dos pacientes sem FLP	Cárie / CPOD / categorias: livre de cárie; 1-3; 4-7; >8 lesões	gênero idade(12 a 29 anos) ( $\pm$ 3 anos) mesma residência	Não relatado	Associação de cárie e FLP. Gravidade: índice de cárie moderado e alto (caso 85% / controle 45,3% ) (OR= 2,52; IC 95%= 1,389-4,574; $p < 0,05$ ) CPOD médio: caso= 6,83; controle= 3,811 ( $p < 0,001$ )	C

## Cont. Quadro 4

Referência	Caso / controle (n)	Desfecho / Critério de avaliação	Pareamento	No. Avaliadores / Reprodutibilidade	Resultado	Grau de evidência
Parapanisiou <i>et al.</i> , 2009	41 / 41	Cárie/ CPOD- ceo – lesões não- cavitadas (KOCH <i>et al.</i> , 1967)/ RX / ICDAS (ISMAIL <i>et al.</i> , 2005)	gênero idade (4-18 anos) tratamento ortodôntico	2 / sim	Prevalência de lesões cavitadas semelhante nos 2 grupos. Maior número de lesões não cavitadas (incisivos superiores), no grupo FLP. OR=?	B
Mutarai <i>et al.</i> , 2008	69 / 69	Cárie/ ceo / WHO e lesões ativas não-cavitadas	idade (18 a 36 meses) gênero região de domicílio escolaridade do cuidador	1 / sim	Mais cárie no grupo caso ( $p < 0,05$ ) e forte associação entre consumo noturno de açúcar e cárie ( $r^2 = 0,32$ ).	B

Cont. Quadro 4

Referência	Caso / controle (n)	Desfecho / Critério de avaliação	Pareamento	No. Avaliadores / Reprodutibilidade	Resultado	Grau de evidência
Cheng <i>et al.</i> , 2007b	20 FLP / 20 não FLP sem aparelho fixo (AOF); 30 FLP / 30 não FLP com AOF	Cárie / CPOD / WHO	idade (12 a 17 anos)	1 / não	CPOD médio em FLP com AOF ( $1,93 \pm 0,33$ ) menor que dos demais grupos e que da média OR=?	C
Stec-Slonicz <i>et al.</i> , 2007	100 (37 poloneses e 63 alemães) / dados nacionais	Cárie / CPOD / WHO	idade (3,5 a 18 anos) 6-12 anos 13-18 anos gênero	1 avaliador e 1 revisor / não	Maior CPOD em FLP poloneses que FLP alemães ( $p < 0,05$ ). Ambos com mais cárie que a população geral. OR=?	C

O Quadro 5 mostra o grau de evidência dos estudos incluídos nesta revisão crítica. Apenas o estudo de Cheng e colaboradores (2007b) mostrou CPOD médio em pacientes com FL/P e que utilizavam aparelho ortodôntico fixo menor que dos demais grupos e a média. Isso foi relacionado ao programa de prevenção ao qual os pacientes com FL/P e com AOF estavam inseridos.

Quadro 5: Grau de evidência dos estudo incluídos na revisão crítica.

Referência	Grau de evidência
Hazza'a <i>et al.</i> , 2011	B
Britton & Welbury, 2010	C
Zhu <i>et al.</i> , 2010	B
Al-Dajani, 2009	C
Parapanisiou <i>et al.</i> , 2009	B
Mutari <i>et al.</i> , 2008	B
Cheng <i>et al.</i> , 2007b	C
Stec-Slonicz <i>et al.</i> , 2007	C
Hasslof & Twetman, 2007	A

Exceto pela revisão sistemática (HASSLOF; TWETMAN, 2007), foi encontrada evidência baixa a moderada dos estudos elegíveis. Foi observada maior experiência de cárie em indivíduos com FL/P comparados a indivíduos sem FL/P. Isto demonstra evidente necessidade de melhorar a qualidade das pesquisas nesta área, a fim de formular as diretrizes de tratamento baseada em evidências científicas sólidas.

### 2.3 Microrganismos relacionados à cárie em pacientes com FL/P

A prevalência de *S. mutans* e *Lactobacillus* na saliva e biofilme dental de 62 crianças portadoras de fissura de lábio e/ou palato, de 18 meses de vida foi estudada. Além da análise microbiológica, os pesquisadores entrevistaram os responsáveis pelas crianças buscando dados sobre a saúde geral do bebê, hábitos alimentares, exposição ao flúor e classe sócio-

econômica. Foram encontrados *S. mutans* em 45% das amostras de saliva e em 48% das amostras de biofilme; os *Lactobacillus* spp foram encontrados em 16% e 8% respectivamente. O consumo de alimentos entre as refeições principais foi associado à presença de *S. mutans* na saliva, e a utilização de dispositivos ortopédicos pré-cirúrgicos, como placas de acrílico, logo após o nascimento, foi associada à presença de *Lactobacillus* spp na saliva. Os resultados do estudo indicaram que as crianças portadoras de FL/P têm maior risco de infecção precoce por microrganismos ligados à cárie dentária. Este fato está relacionado com os hábitos alimentares e os procedimentos reabilitadores do paciente. A infecção precoce indica maior risco de cárie na dentição decídua (BOKHOUT *et al.*, 1996).

Um estudo realizado com crianças brasileiras com FL/P observou altos níveis de *S. mutans* e *Lactobacillus* spp, microrganismos que estão relacionados a um alto risco de cárie. Também foram observadas proporções elevadas destes microrganismos na cavidade bucal das mães dessas crianças (VILELA *et al.*, 1996).

Com objetivo de investigar a transmissão de *S. mutans* da mãe para o bebê com FL/P, foram utilizados 21 pares de amostras de saliva mãe/filho que foram cultivadas em meio de crescimento seletivo para *S. mutans*. Pelo menos cinco colônias de cada morfologia foram isoladas e identificadas por PCR. Os pesquisadores verificaram uma correlação entre cepas de *S. mutans* em 1/3 dos pares mãe-filho. Dados similares são encontrados em crianças sem FL/P (SOET *et al.*, 1998).

Um estudo comparou a prevalência de cárie, biofilme e gengivite em crianças portadoras FLP unilateral, relacionando a microbiota bacteriana com um grupo controle de crianças sem FL/P. Observou-se que a frequência de isolamento e o número de *S. mutans* e *Lactobacillus* spp foram semelhantes entre os dois grupos. Entretanto, foi observado maior número de cavidades não restauradas nos dentes dos indivíduos com FLP, confirmando a necessidade de estratégias diferenciadas para tratamento desses pacientes (LUCAS *et al.*, 2000).

Sabendo-se que a maioria dos indivíduos com FL/P é submetida, em algum momento do tratamento, à movimentação ortodôntica com aparelhos fixos, foi realizado um estudo para verificar se os indivíduos com FL/P submetidos ou não a tratamento ortodôntico têm um perfil bioquímico e níveis de *S. mutans* e *Lactobacillus* spp salivares diferentes daqueles exibidos por indivíduos sem FL/P submetidos ou não a tratamento ortodôntico. Cento e dez indivíduos com idade entre 12 e 17 anos foram recrutados em um dos quatro grupos; dois controles: compostos de indivíduos com e sem FL/P, que não foram submetidos a tratamento ortodôntico; e 2 grupos tratamento: compostos de indivíduos com e sem FL/P submetidos a tratamento ortodôntico. O fluxo salivar, o pH da saliva estimulada e não



estimulada, a capacidade tampão, a quantidade de *S. mutans* e *Lactobacillus* spp foram verificados. Foram implementadas medidas de promoção de saúde no grupo de indivíduos com FL/P em tratamento ortodôntico. Foi verificado que indivíduos com FL/P submetidos a tratamento ortodôntico e às medidas de promoção de saúde tendiam a apresentar perfis microbiológicos e salivares menos favoráveis ao desenvolvimento de cáries que os demais indivíduos incluídos no estudo. Os autores concluíram que medidas como reforço de higiene oral e educação para a saúde bucal parecem ter um efeito positivo na redução da porcentagem de indivíduos com contagens de *S. mutans* superiores a  $10^5$  UFC / mL de saliva (CHENG *et al.*, 2007b).

#### **2.4 Os estreptococos do grupo mutans e os estudos biomoleculares**

A complexidade da microbiota presente no biofilme dental dificulta a determinação de um agente bacteriano único na etiologia da cárie (FEJERSKOV, 2004). No entanto, existem evidências de que microrganismos Gram-positivos acidogênicos, acidúricos e com capacidade de aderência às superfícies dentárias, pertencentes aos estreptococos do grupo mutans, estão envolvidos neste processo (LOESCHE, 1986). Este grupo é constituído por sete espécies: *Streptococcus cricetus*, *S. downei*, *S. ferus*, *S. macacae*, *S. mutans*, *S. rattus* e *S. sobrinus* (WHILEY ; BEIGHTON, 1998), classificadas com base em diferenças nas características genéticas, antigênicas e bioquímicas. Dentre as espécies, o *S. mutans* e o *S. sobrinus* são isolados com frequência da placa dental humana e estão fortemente associados à cárie (SEOW, 1998).

As bactérias do grupo mutans são cocos Gram positivos, com morfologia ovalada, medem aproximadamente 0,5 a 0,75  $\mu\text{m}$  de diâmetro, agrupam-se em pares ou em cadeias, requerem meios nutricionalmente ricos para seu crescimento e temperatura média de 37°C. Em meio de cultura ágar Mitis Salivarius acrescido de bacitracina (AMSB), formam colônias pequenas, com bordos irregulares, fortemente aderidas ao meio. Com adição de sacarose ao ágar, muitas linhagens de *S. mutans* produzem colônias de cerca de 1 mm de diâmetro. O meio de cultura mais frequentemente utilizado para o isolamento primário de *S. mutans* é o ágar Mitis Salivarius com adição de sacarose, bacitracina e telurito de potássio (GOLD *et al.*, 1973). A identificação tradicional de *S. mutans* é baseada na sua morfologia à microscopia óptica e características de crescimento específicas quanto ao padrão enzimático e assimilação de açúcares (GRÖNROOS, 2000; KONEMAN *et al.*, 2001).

Os estreptococos do grupo mutans foram originalmente descritos como uma única espécie: *S. mutans*, dividida em oito subgrupos designados de *a* a *h* em função da especificidade sorológica dos antígenos de carboidratos da parede celular. Mais tarde, esses vários sorotipos foram classificados em categorias de espécies independentes: *S. mutans* (que inclui os sorotipos: *c*, *e*, *f*) e *S. sobrinus* (sorotipos *d* e *g*), membros do grupo mutans que predominam no homem (BENTLEY *et. al.*, 1991).

O Quadro 6 identifica as principais características dos estreptococos do grupo mutans e fontes de isolamento.

Quadro 6: Características diferenciais das espécies de estreptococos do grupo mutans, os sorotipos e a principal fonte de isolamento.

Característica	Características das espécie de <i>Streptococcus</i>				
	<i>mutans</i>	<i>cricketus</i>	<i>sobrinus</i>	<i>rattus</i>	<i>macacae</i>
Fermentação de	manitol	+	+	+	+
	sorbitol	+	+	d	+
	melibiose	+	d	d	+
	rafinose	+	+	d	+
Hidrólise de	arginina	-	-	-	+
	esculina	+	d	d	+
Produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	+	-	-
Resistência à bacitracina -2UI/mL	+	-	+	+	-
Sorotipo	c, e, f	a	d, g	b	h
Fonte	homem	hamster homem ratos	homem	ratos	macaco
% de isolamento no homem	90%	raro	7-35%	raro	0%

Legenda: (+) 90% das cepas ou mais positivas, (-) 90% das cepas ou mais negativas, (d) proporção substancial difere. Adaptado de *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (HARDIE, 1986).

Estudos epidemiológicos têm relatado a ocorrência de *S. mutans* e *S. sobrinus* na cavidade bucal humana, sendo que a frequência de isolamento de *S. mutans* na placa dental é maior do que a de *S. sobrinus* (LOESCHE, 1986; NAPIMOGA *et al.*, 2004; PALMER *et al.*, 2010). Indivíduos colonizados por *S. mutans* e *S. sobrinus* tendem a apresentar maior

prevalência de cárie que aqueles colonizados apenas por *S. mutans* (KÖHLER *et al.*, 1988; NURELHUDA *et al.*, 2010).

Além da tolerância aos ácidos e produção de ácidos, os *S. mutans* ainda possuem como mecanismos de virulência, a capacidade de sobrevivência no biofilme dental devido à alta capacidade de adaptação ao ambiente, presença de adesinas na superfície celular, produção de glicosiltransferases, mutacina e polissacarídeos extracelulares. Em adição a esses fatores, outras propriedades podem influenciar a virulência de *S. mutans*, entre elas a atividade proteolítica, capaz de degradar colágeno dos substratos (HOMER *et al.*, 1990, HARRINGTON; RUSSEL, 1994; JACKSON *et al.*, 1997; SMITH; SPATAFORA, 2011).

O uso de métodos moleculares, como aqueles baseados na Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (*Polimerase Chain Reaction*), associados aos métodos fenotípicos clássicos, têm permitido o aprimoramento da identificação e um maior conhecimento sobre as relações de comensalismo e patogenicidade que as espécies e subespécies de microorganismos do biofilme dental estabelecem com o hospedeiro (SAIKI *et al.*, 1988). Métodos de tipagem molecular possuem um maior poder discriminatório e confiabilidade quando comparados aos métodos tradicionais baseados na mensuração de propriedades fenotípicas (SAARELA *et al.*, 1996).

A sequência completa do genoma do *S. mutans* (ADJIC *et al.*, 1999), possibilitou um melhor entendimento da complexidade e especificidade genética deste organismo. De acordo com a análise do seu genoma, o *S. mutans* é capaz de metabolizar a mais vasta variedade de carboidratos, do que qualquer outro microorganismo Gram-positivo sequenciado até o momento, podendo sintetizar todos os seus aminoácidos necessários. O número de proteases, peptidases e outras exoenzimas produzidas pelo *S. mutans* sugere claramente que ele obtém recursos dos tecidos de seu hospedeiro. A análise da sequência genômica mostrou que aproximadamente 16% de seus ORFs (*Predicted Protein-Encoding Open Reading Frames*) especificam genes únicos e revelam a prevalência de muitos genes não caracterizados previamente como envolvidos na virulência, transporte e regulação gênica. Estas descobertas provêm base para o desenvolvimento futuro de drogas e novas abordagens na prevenção e tratamento da cárie dental, como as vacinas anti-cárie (MOREIRA, 2006).

O conhecimento sobre a composição da microbiota bucal auxilia na determinação do risco individual à cárie dentária (NURELHUDA *et al.*, 2010)

Já foi observado que indivíduos cárie-ativos albergam um maior número de genótipos de *S. mutans* com alta capacidade de sintetizar glucanos insolúveis (GI), quando comparado com genótipos isolados de indivíduos livres de cárie. A síntese de GI foi positivamente correlacionada com a habilidade do microrganismo em aderir à superfície de vidro ( $p < 0,05$ ). Existe uma maior síntese de GI entre cepas de *S. mutans* de indivíduos cárie-ativos comparado a de indivíduos livres de cárie (NAPIMOGA *et al.*, 2004). A sacarose facilita o aumento de níveis de estreptococos do grupo mutans na placa dental, pois a partir deste carboidrato tais microrganismos sintetizam GI que favorecem sua aderência e acúmulo na placa dental (HAMADA; SLADE, 1980; LOESCHE, 1986).

Um estudo verificou que crianças com cárie precoce severa tem maior contato com alimentos cariogênicos entre as refeições principais que crianças livres de cárie. Observaram também que *S. mutans* ( $p < 0,005$ ), *S. sobrinus* ( $p < 0,005$ ), e *Bifidobacteriaceae spp* ( $p < 0,0001$ ) estavam associados à severidade da cárie precoce. Os *S. mutans* quando juntos aos *S. sobrinus* estavam associados com a recorrência das lesões de cárie ( $p < 0,05$ ) (PALMER *et al.*, 2010).

Variações nos fatores de virulência de *S. mutans* também podem influenciar o desenvolvimento da cárie dental (CAUFIELD, 1993). Fatores como a acidogenicidade, aciduricidade, e a síntese GI a partir da sacarose através da ação de glicosiltransferases (GTF), estão relacionados à capacidade do *S. mutans* em colonizar as superfícies dentais e a indução de cárie (SMITH; TAUBMAN, 1997). Já foi demonstrada correlação positiva entre a síntese de GI e a capacidade de adesão ao vidro em isolados de *S. mutans* de crianças com lesões de cárie ativas, sugerindo haver a presença de genótipos mais virulentos em indivíduos que desenvolvem cárie dental (MATTOS-GRANER *et al.*, 2000).

Além de maior contagem total de microrganismos, foi também identificado um maior número de genótipos na cavidade bucal de indivíduos cárie-ativos quando comparado aos indivíduos livres de cárie (ALALUUSUA *et al.*, 1996 e NAPIMOGA *et al.*, 2004)

A existência de múltiplos genótipos bacterianos na placa dental pode ser consequência de circunstâncias favoráveis à colonização de estreptococos do grupo mutans. Um ambiente mais propício parece suportar o crescimento de múltiplos genótipos mais adaptados. É possível que a ação simultânea de algumas cepas com potenciais cariogênicos distintos possa elevar o risco à cárie. No biofilme dental os microrganismos estão expostos a diversas situações de estresse fisiológico, como excesso ou limitação de nutrientes, baixo pH, alta osmolaridade, oxidação e frequente exposição a antimicrobianos (MARSH, 2000).

Apesar da literatura afirmar que a variabilidade genética dos estreptococos do grupo mutans seja refletida no nível fenotípico e nas diferenças no potencial cariogênico entre as linhagens, um estudo observou, por meio de diversos métodos moleculares, homogeneidade na distribuição dos genes de virulência e elementos genéticos analisados de 33 cepas isoladas tanto de crianças com cárie precoce severa ou livres de cárie (ARGIMÓN; CAUFIELD, 2011).

Em outro estudo, a microbiota de amostras de placa dental de crianças de 2 a 6 anos com cárie precoce severa e de um grupo controle livre de cárie foi caracterizada pela técnica de AP-PCR. Foi encontrada associação positiva entre ocorrência *S. mutans* ( $p < 0,005$ ) e *Bifidobacteriaceae spp* ( $p < 0,0001$ ) com cárie severa (KANASI *et al.*, 2010).

A associação entre a experiência de cárie, condição sócio-econômica e dieta com a presença e quantidades relativas de *S. mutans* e *S. sobrinus* foi verificada em 140 amostras de saliva utilizando *quantitative real-time PCR* (qPCR). Destas amostras, 30 eram de indivíduos com experiência de cárie. A razão média das diferenças entre *S. mutans* e *S. sobrinus* foi de 0,77 (DP 5,4) e 2,29 (SD 6.0) para amostras obtidas a partir de indivíduos livres de cárie e cárie-ativos, respectivamente. Isto sugere que a proporção de *S. sobrinus* foi superior ao *S. mutans* no grupo cárie-ativo. Foi observada associação entre lesões de cárie ativa e o consumo frequente de doces pegajosos e melhor nível sócio-econômico. *S. sobrinus* mostrou-se associado com a experiência de cárie na população (NURELHUDA *et al.* 2010).

A presença de *S. mutans* no biofilme dental de adolescentes de 12 a 19 anos, moradores da zona rural do Haiti, foi determinada por dois métodos moleculares, o PCR padrão e o (qPCR). Foram analisadas 54 amostras de biofilme supra-gengival e 98 de sub-gengival obtidas de 104 indivíduos. Todos os participantes foram submetidos ao exame clínico dental e periodontal. A prevalência de cárie foi de 42,2% e o CPOS médio foi de  $2,67 \pm 5,3$ . O *S. mutans* foi detectado em 67,3% por qPCR e em 38,8% por PCR padrão das amostras de placa supra-gengival ( $p < 0,01$ ), e em 36,6% por qPCR e 8,1% pela PCR das amostras sub-gengivais ( $p < 0,01$ ). A idade e o sexo não foram significativamente correlacionados com a colonização bacteriana. Os resultados demonstraram uma prevalência moderada a alta de *S. mutans* na população, e que a qPCR é mais sensível que a PCR padrão (PSOTER *et al.*, 2010).

A diversidade genotípica de *S. mutans* em pré-escolares livres de cárie e cárie-ativos foi determinada por AP-PCR. As crianças foram examinadas para experiência de cárie (ceo) e o DNA de 280 isolados de *S. mutans* foi extraído e avaliado utilizando o método de PCR. O teste de correlação de Spearman mostrou forte associação entre a diversidade genotípica e experiência de cárie ( $r = 0,72$ ,  $p < 0,001$ ). Havia mais genótipos de *S. mutans* no grupo de

crianças com cárie dentária, em comparação com o grupo livre de cárie. Entre as crianças com mais de um genótipo, 13 tinham cárie dentária (2-5 genótipos) e quatro estavam livres de cárie (apenas 2 genótipos) (PIERALISI *et al.*, 2010).

# *Objetivos*

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Comparar a experiência de cárie e a presença de estreptococos do grupo mutans em adolescentes e adultos jovens com fissura labial e/ou palatina com um grupo controle sem fissura e verificar associação entre experiência de cárie e variáveis biológicas e ambientais.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- a) Comparar a experiência de cárie de adolescentes e adultos jovens com FL/P com um grupo controle sem fissura.
- b) Comparar o grau de escolaridade materna, a renda familiar, os hábitos de higiene e de dieta, o contato com fluoretos, o índice de placa visível e o sangramento à sondagem dos grupos de estudo.
- c) Comparar a presença de *S. mutans* e *S. sobrinus* nos grupos de estudo.
- d) Verificar associação da experiência de cárie (expressa por CPOD e componentes, CPOS e componentes, superfícies com lesões ativas de cárie) com a presença de *S. mutans* e *S. sobrinus*.
- e) Verificar associação da experiência de cárie (expressa por CPOD e componentes, CPOS e componentes, superfícies com lesões ativas de cárie) com as variáveis ambientais (presença de fissura, hábitos de higiene, contato com fluoretos, contato diário com sacarose, índice de placa visível, renda *per capita*, utilização de aparelho ortodôntico e última visita ao dentista).



*Metodología*

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Delineamento do estudo e seleção dos indivíduos**

Este é um estudo transversal controlado no qual uma amostra não probabilística de 30 pacientes com FL/P em atendimento no Centro Pró-Sorriso da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), com idade entre 12 e 21 anos, foram examinados entre março e dezembro de 2010, constituindo o grupo caso. Os sujeitos foram recrutados por conveniência, de acordo com o agendamento de suas consultas para tratamento no Centro de Referência.

O Centro Pró-Sorriso da UNIFENAS, localizado em Alfenas, MG, foi criado em 1992, e é credenciado em alta complexidade pelo Ministério da Saúde, para o atendimento de pacientes com deformidades crânio-faciais congênitas ou adquiridas. Provê atenção multidisciplinar, envolvendo diferentes áreas da Odontologia, além da Medicina, Psicologia, Fonoaudiologia, Nutrição e Enfermagem.

Foram excluídos pacientes com síndromes associadas à FL/P; pacientes que tinham feito uso de substância antimicrobiana ou imunossupressora há pelo menos três meses do início do estudo e pacientes com dentadura mista (dentes decíduos e permanentes).

Foram incluídos, como controle, 30 indivíduos sem fissura, selecionados dentre os pacientes atendidos na Clínica Integrada do Curso de Odontologia, da mesma Instituição à qual o Centro de Referência é anexo. Os critérios de exclusão foram os mesmos adotados para o grupo de pacientes com FL/P. Para evitar possível viés de seleção, também foram excluídos pacientes que nunca haviam recebido tratamento odontológico. Este viés estaria relacionado à instrução de higiene bucal e acesso ao tratamento odontológico, pois os indivíduos com FL/P, normalmente, frequentam serviços de saúde, inclusive odontológicos, desde seu nascimento.

Todos os voluntários e representantes legais foram instruídos sobre os objetivos, a importância e a metodologia da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa das Instituições envolvidas (ETIC 3297/09 - UFMG e 167/2008 - UNIFENAS) (APÊNDICE).

## 4.2 Pareamento

Os indivíduos dos grupos Caso e Controle foram pareados de acordo com gênero, idade, condições de vida e utilização ou não de dispositivo ortodôntico.

Para a variável idade foi feito pareamento de forma que houvesse no máximo dois anos de diferença entre os pares, dentro da idade estabelecida nos critérios de inclusão (12 a 21 anos).

No pareamento de “condições de vida” foram utilizados o Índice de Necessidade em Saúde (INS) da Fundação João Pinheiro (MINAS GERAIS, BRASIL, 2004) e o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do município de origem do indivíduo (BRASIL, 2003).

O INS foi construído a partir da análise de informações epidemiológicas e sócio-econômicas de cada município do Estado de Minas Gerais, Brasil, a fim de promover uma alocação equitativa de recursos financeiros estatais. O IDH é uma medida comparativa de riqueza, alfabetização, educação, esperança de vida, natalidade entre outros fatores.

## 4.3 Coleta de dados

Utilizando uma ficha própria, foram coletadas informações referentes às variáveis: tipo de FL/P, idade, gênero, município de origem, renda familiar *per capita*, contato com fluoretos, hábitos de higiene, última visita ao dentista e escolaridade materna. Também, foi aplicado um diário dietético recordatório de 24 horas, a fim de verificar o contato do paciente com alimentos cariogênicos.

A informação sobre o tipo de fissura foi obtida dos prontuários e foram classificadas em: fissura labial (FL) (uni ou bilateral), fissura labial com envolvimento do osso alveolar (FLA) (uni ou bilateral), fissura palatina (FP) (envolvendo palato duro e/ou mole) e fissura lábio-palatina (FLP) (uni ou bilateral).

Para obter a informação sobre renda *per capita*, perguntou-se quantas pessoas moravam na residência, quantas trabalhavam ou recebiam aposentadoria ou pensão, e quanto cada um recebia por mês. A renda total da família foi dividida pelo número de moradores da residência.

O contato com fluoretos foi investigado por meio de três questões distintas: utilização de dentífrico fluoretado, de bochechos com soluções fluoretadas e abastecimento de água encanada e tratada na residência.

Para o relato dos hábitos de higiene oral, perguntou-se a frequência de escovação dentária e do uso de fio dental.

O acesso ao tratamento odontológico referiu-se à última vez que o voluntário havia feito tratamento odontológico. Como todos os pacientes de ambos os grupos estavam sob tratamento odontológico, esta informação foi confirmada no prontuário após resposta do voluntário à pergunta.

O grau de instrução materno foi convertido em anos de estudo para fins de análise estatística.

#### **4.3.1 Coleta de biofilme**

Para coleta das amostras clínicas de biofilme dental foi feito isolamento relativo da área com roletes de algodão, aspiração de saliva através de sugadores descartáveis e secagem dos dentes com jatos de ar.

O biofilme supra-gengival foi coletado com *swab* estéril em 5 dentes: um molar (definido por sorteio) e quatro dentes adjacentes à área da fissura. Em casos de fissuras unilaterais: dois dentes à mesial e dois à distal da fissura; em fissuras bilaterais: dois dentes na pré-maxila e um à distal da fissura, em ambos os hemi-arcos; em fissuras palatinas isoladas: quatro dentes mais próximos da linha média.

A ponta de algodão foi friccionada por 10 segundos em cada dente para a completa saturação. No grupo controle a coleta foi feita nos dentes similares àqueles do grupo caso, considerando-se o lado e o dente.

Cada *swab* foi inserido, separadamente, em tubos de microcentrífuga de 2 mL, contendo 500µL de salina estéril, e encaminhados ao Laboratório de Biologia de Fisiologia de Microrganismos da UNIFENAS onde prosseguiram-se as etapas de isolamento e identificação dos microrganismos.

### 4.3.2 Exame clínico

Os exames clínicos foram realizados em consultório odontológico com espelho clínico plano, sonda especial modelo OMS e sob iluminação de refletor.

Foram registrados os índices de placa visível (AINAMO; BAY, 1975) e de sangramento à sondagem (MUHLEMAN; SON, 1971). O sangramento foi registrado após sondagem do sulco gengival nas superfícies vestibular e lingual, abrangendo as regiões mesial, média e distal

Após receber instrução para higiene bucal e controle de placa profissional, cada participante teve as superfícies dentárias examinadas antes e após secagem com jato de ar. Foram coletados os índices CPOD e CPOS, e registradas as lesões de cárie ativa (ISMAIL *et al.*, 2005).

### 4.4 Reprodutibilidade

Um único examinador treinado realizou todos os exames. O treinamento envolveu a discussão teórica dos critérios, códigos e técnicas referentes a todas as etapas da pesquisa. Seis pacientes foram reexaminados com intervalo de 7 dias após o primeiro exame dentário para avaliação da concordância intra-examinador. Obteve-se concordância excelente, kappa ponderado= 0,87 (LANDIS; KOCH, 1977).

### 4.5 Isolamento dos microrganismos

Visando a obtenção de uma suspensão uniforme, as amostras de biofilme coletadas foram submetidas a 60 segundos de vibração em um agitador orbital (Agitador de tubos, vórtex, AP 56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil), e posterior diluição em série decimal de  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , em solução salina 0,9%.

Para o cultivo dos estreptococos, alíquotas de 100µL de cada diluição foram inoculadas em placas de Petri (5 x 12 cm), contendo 15 mL de meio ágar *Mitis Salivarius* com bacitracina 200 U/L, 15% de sacarose e 1% de telurito de potássio - AMSB (GOLD *et al.*, 1973).

Após, foi realizada a incubação em estufa de bacteriológica (modelo 002CB, Fanem Limitada, São Paulo, SP, Brasil), a 37° C por 48 h em atmosfera com pCO<sub>2</sub> de 10%. Havendo crescimento positivo, 10 colônias de morfologia característica foram isoladas das placas.

Foi observada, neste momento, além da morfologia celular, a produção de enzima catalase através do gotejamento de peróxido de hidrogênio a 3% sobre uma colônia em uma lâmina de vidro. A prova foi considerada positiva quando ocorreu o desprendimento de bolhas (WHITTENBURY, 1964). A morfologia celular também foi observada microscopicamente em esfregaços das culturas coradas pelo método de Gram. Apenas colônias que apresentaram morfologia colonial e celular típica de estreptococos, e com resultado negativo na prova de produção de enzima catalase foram isoladas.

As colônias com tais características foram transferidas individualmente para tubos contendo 3 mL de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas em condições ótimas para o desenvolvimento celular (37°C, 10% CO<sub>2</sub>). Após o crescimento bacteriano, alíquotas de 1mL do subcultivo foram armazenadas em duplicata a -70°C em BHI-Glicerol 20%, para análises posteriores. A pureza dos isolados armazenados foi conferida através de coloração pelo método de Gram. Todos os procedimentos microbiológicos foram realizados em câmara de fluxo laminar vertical (PA320, Pachane, Piracicaba, SP, Brasil).

## **4.6 Identificação dos microrganismos por PCR**

### **4.6.1 Extração do DNA bacteriano**

Para obtenção do DNA bacteriano, os isolados conservados a -70°C em BHI-Glicerol, foram reativados em 20 mL caldo BHI, num tubo tipo Falcon (50 mL) e incubados a 37°C por 24 h com pCO<sub>2</sub> de 10%. Após o crescimento bacteriano, as células foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (6.000 rpm por 2 min a 4°C), o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado com 5 mL de tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0). Após agitação em vórtex, nova centrifugação nas mesmas condições, e descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 2 mL de tampão TE pH 8,0. Neste momento, 1 mL da solução resultante foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 2mL (duplicata), e centrifugado (7.500 rpm por 5 min a 4°C – Centrifuga 5417R, *ependorf*, Hamburg, Germany). O sobrenadante foi descartado e as células submetidas ao processo de extração do DNA (DOYLE; DOYLE, 1987).

Para extração, as células foram homogeneizadas com 500 µL de tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 0,1 M com pH 8,0, EDTA 20 mM, 2-mercaptoetanol 0,2%) e pérolas de vidro, e mantidas em banho-maria a 60°C por 45 min. Durante este período, a cada 10 min, foi realizada nova homogeneização em vórtex. Após o retorno à temperatura ambiente, foram emulsionadas com 500µL de clorofórmio e álcool isoamílico (CIA - 24:1) recém preparada com o álcool gelado, por movimentos de inversão, e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min. A fase aquosa superior resultante foi transferida para novos microtubos de 2 mL.

O DNA foi então precipitado com 1 mL isopropanol gelado e centrifugado a 14.000 rpm por 10 min. Após descarte do sobrenadante, o DNA foi lavado com solução gelada de acetato de amônio e etanol, e novamente centrifugado a 14.000 rpm por 10 min. Após descarte do sobrenadante, o DNA foi seco à temperatura ambiente, e ressuspenso em tampão TE (pH 7,4).

A concentração de DNA foi calculada medindo a absorbância a 260nm (Espectrofotômetro digital, LABSP220, faixa de 200-1000nm, LABORANA, São Paulo, SP, Brasil), e as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para verificação de integridade. Alíquotas das amostras de DNA foram conservadas a -20°C.

#### 4.6.2 PCR

As amostras de DNA foram submetidas à PCR para a identificação molecular de *S. mutans* e de *S. sobrinus*, com a utilização de pares *primers* específicos para a porção do gene correspondente à glicosiltransferase (*gtfB* de *S. mutans*, *gtfI* de *S. sobrinus*) listados no Quadro 7.

Quadro 7: *Primers* utilizados para identificação de *S. mutans* e *S. sobrinus* pela técnica de PCR (OHO *et al.*, 2000).

Espécie	<i>Primers</i> : Sequência	Posição
<i>S. mutans</i>	GTFB-F: 5'- ACT ACA CTT TCG GGT GGC TTG G - 3'	(517 pb)
	GTFB-R: 5'- CAG TAT AAG CGC CAG TTT CAT C -3'	
<i>S. sobrinus</i>	GTFI-F: 5'- GAT AAC TAC CTG ACA GCT GAC T - 3'	(712 pb)
	GTFI-R: 5'- AAG CTG CCT TAA GGT AAT CAC T -3'	

A reação de PCR foi processada em 30µL de uma mistura de reagentes [10 µL de solução tampão 5X (Green- Promega®), 6 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µL de dNTP 200 µM, (DNA Polymerization Mix; INVITROGEN® – Life Technology do Brasil), 1,25 µL de cada *primer*, 25 pmol de Taq DNA Polymerase 1,5 U/ µL (INVITROGEN® – Life Technology do Brasil)] e uma alíquota de 20 µL de cada amostra de DNA 200 ng/mL.

Além das amostras de DNA, em cada reação de PCR, foram utilizados controles positivos, DNA extraído de *S. mutans* (ATCC 25175) e de *S. sobrinus* (ATCC 27607), e negativo (água bi-destillada e deionizada).

A mistura reagente foi submetida a um termociclador convencional (PTC – 200, Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Bio-Rad Laboratories Inc., Berkeley, California, USA) com ambos os *primers* (*S. mutans* e *S. sobrinus*) de acordo com as seguintes condições térmicas: 3 min de aquecimento inicial a 92°C, 30 ciclos de desnaturação do DNA a 95°C por 30 segundos, seguida da fase de hibridização dos *primers* a 59°C por 30 segundos e fase de extensão a 72°C por 1 min. Após os ciclos, finalizou-se o processo com as amostras a 72°C por 3 min (OHO *et al.*, 2000).

#### 4.6.3 Análise por eletroforese

Os amplicons foram analisados por eletroforese, em gel de agarose 1,8% (INVITROGEN® - Life Technology do Brasil) em tampão TBE, imediatamente ou armazenados em freezer a – 20°C por até 24h.

O princípio para utilização da eletroforese para análise de DNA baseia-se no fato da molécula de DNA possuir carga negativa em valores de pH neutro ou alcalino e conseqüentemente, quando aplicado ou imerso em uma matriz de gel submetida a um campo elétrico, migra em direção ao pólo positivo (ânodo). A velocidade da migração depende do tamanho da molécula. Por isso em um dado momento da eletroforese, moléculas de tamanhos distintos se encontram em diferentes pontos da matriz.

O gel usado foi de agarose, normalmente eleito para a separação de fragmentos que variam de 0,2 kb a 50 kb (1 kb = 1000 pb). O tampão TBE (Tris-Borato-EDTA, pH 8,0) [TBE 1× (89mM Tris-base, 89mM ácido bórico, 2mM EDTA)] foi escolhido pois é preferido para a separação de moléculas pequenas de DNA, menores do que 1 kb, e para longas corridas



devido a sua maior capacidade tamponante. Ressalta-se que ácido bórico é utilizado para ajustar o valor de pH da solução e atua como eletrólito para a manutenção da corrente. O EDTA serve como um agente quelante que sequestra íons de magnésio, entre outros. Isto é particularmente interessante para proteger o DNA via inibição de nucleases que por sua vez dependem da presença de magnésio para degradar o DNA.

Após a mistura da agarose em tampão TEB, esta foi dissolvida em micro-ondas até que a solução ficasse homogênea e transparente. Aguardou-se a diminuição da temperatura até aproximadamente 50°C e a solução foi vertida nas bandejas específicas para cada cuba de eletroforese. Sobre a solução ainda morna colocou-se um pente para produzir os poços no gel onde os *amplicons* foram posteriormente aplicados.

Após gelificação da agarose, a bandeja contendo o gel foi colocada no interior da cuba de eletroforese horizontal. Na cuba, o gel encontra-se entre fios de platina que atuam como cátodo e ânodo provocando a passagem de corrente elétrica gerada por uma fonte de eletricidade. Adicionou-se o tampão TBE suficiente para que o gel ficasse totalmente imerso tomando-se o cuidado para que o nível de tampão ficasse pelo menos 1 mm acima do gel. A seguir o pente foi cuidadosamente retirado e 15µL dos produtos amplificados foram aplicados no gel.

Em cada gel foi incluído um padrão de peso molecular de 1kb (INVITROGEN® - Life Technology do Brasil). Após a corrida eletroforética (75 volts por 2 horas), as bandas de DNA foram coradas com solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) por 15 min, visualizadas em transluminador UV (Pharmacia LKB-MacroVue, San Gabriel, CA, USA) e analisadas.

O Brometo de etídio se intercala entre as bases dos ácidos nucléicos e, na presença de luz Ultra Violeta (entre 260 e 360nm), fluoresce em vermelho alaranjado (590nm). Com este método pode-se detectar uma quantidade igual ou maior que 10 ng de DNA e a intensidade de fluorescência emitida é proporcional à concentração de DNA presente na amostra.

A identificação foi considerada positiva para *S. mutans* ou *S. sobrinus* se houvesse formação de banda fluorescente em região específica (517 pb e 712 pb, respectivamente).

#### **4.7 Análise estatística**

Os dados das avaliações clínicas foram analisados utilizando o programa estatístico SPSS Statistics Data Editor 17.0 for Windows. Foi adotado nível de significância de 5%. O teste de

McNemar foi aplicado para comparar variáveis dicotômicas por se tratar de grupos pareados. O teste t pareado e o teste de Wilcoxon foram usados para comparar variáveis quantitativas com distribuição normal e não-normal, respectivamente.

Realizou-se comparação entre os grupos para a prevalência dos estreptococos do grupo mutans (teste de McNemar).

A associação entre a experiência de cárie (expressa por CPOD e componentes, CPOS e componentes, e superfícies com lesões ativas de cárie) e as variáveis independentes (presença de fissura, contato com fluoretos, hábitos de higiene, escolaridade materna, renda *per capita*, utilização de aparelho ortodôntico, última visita ao dentista, contato com sacarose, IPV e presença de estreptococos do grupo mutans) foi verificada por meio de análise univariada e multivariada por regressão logística *backward stepwise conditional*.

Para análise multivariada, as variáveis contínuas foram dicotomizadas pela média e as ordinais foram pela mediana. O índice de placa visível foi dicotomizado em até 30% das superfícies avaliadas com biofilme e mais que 30% de superfícies com biofilme (Lindhe, 2005)

As covariáveis que apresentaram  $p < 0,25$  nas análises univariadas foram adicionadas ao modelo multivariado. Em todos os modelos multivariados, a presença de fissura foi adicionada devido à sua importância para o estudo.

# *Resultados*

## 5 RESULTADOS

Os resultados deste estudo estão apresentados sob a forma de artigos científicos.

Artigo 1. Caries experience in adolescents and young adults with cleft lip and palate: a controlled cross-sectional study.

Artigo 2. Cárie dentária, fatores ambientais e presença de estreptococos do grupo mutans em jovens com fissura lábio-palatina.

# *Artículo 1*

Caries experience in adolescents and young adults with cleft lip and palate: a controlled cross-sectional study

Amanda Beatriz Dahdah Aniceto Freitas, D.D.S., M.S., Doctorate Student, Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.

Letícia Monteiro de Barros, D.D.S., M.S., Ph.D., Associate Professor, School of Dentistry, Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Brazil.

João Evangelista Fiorini, M.S., Ph.D., Associate Professor, Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Brazil.

Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, M.S., Ph.D., Associate Professor, Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Brazil.

Allyson Nogueira Moreira, D.D.S., Ph.D., Associate Professor, Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.

Claudia Silami Magalhães, D.D.S., M.S., Ph.D., Associate Professor, Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.

Corresponding author:

Claudia Silami Magalhães

Rua Ludgero Dolabela 139, apto 301 Belo Horizonte, MG, Brasil

30430-130

E-mail: silamics@yahoo.com

Running title: Caries in adolescents with cleft lip and palate

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - APQ-00523-09).

Caries experience in adolescents and young adults with cleft lip and palate: a cross-sectional controlled study

#### Abstract

**Objective:** To compare the caries experience of adolescents and young adults with cleft lip and/or palate (CL/P) with a non-cleft control group.

**Design:** Thirty CL/P subjects and 30 controls were clinically examined to obtain the DMFT and DMFS indices, gingival bleeding index, plaque index, and active caries lesions. Data concerning oral hygiene, access to fluoridated water, mother's education level, and family income were also collected.

**Setting:** Pro-Smile Center, a reference center for the treatment of facial deformities, Alfenas, Minas Gerais, Brazil.

**Subjects:** Subjects aged 12-21 years with CL/P and without associated syndromes were matched non-cleft controls by gender, age, living habits, and use of orthodontic devices.

**Null hypothesis formulated before the beginning of data collection:** caries experience in CL/P adolescents and young adults is similar to that observed in the non-cleft controls.

**Statistical analysis:** Data were analyzed using SPSS 17.0 software for Windows Data Editor. Subject and control groups were compared using the McNemar test, paired t-test and Wilcoxon test. A significance level of 5% was adopted for all tests.

**Results:** There were no significant differences between the groups for oral hygiene and contact with fluoride. Significant differences were found in per capita income, presence of active caries, decayed surfaces, plaque index and gingival bleeding.

Conclusions: Adolescents and young adults with CL/P presented more caries than did non-cleft subjects.

Keywords: dental caries, cleft lip and/or palate, cross-sectional, controlled study.



Cleft lip and palate (CLP) are congenital malformations affecting the middle third of the face in varying degrees. The treatment of these clefts consists of a multidisciplinary process that begins at birth and continues into adulthood aiming to promote rehabilitation and social reintegration of the individual (Cheng et al., 2007a).

Studies have reported 0.77 to 1.50 CL/P cases per 1,000 newborns in different regions of Brazil (Arce et al., 1968; Nagem-Filho et al., 1968; Martelli-Junior et al., 2006; Nunes et al., 2007). Approximately 180,000 CL/P patients are estimated to be in Brazil.

CL/P patients are at risk of oral infectious diseases, due to anatomophysiological changes in the maxillary segments, such as tooth malposition, nasal septum deviation or stenosis of the nasal vestibule. Buccal respiration, cicatricial fistulas and fibroses occurring during surgical repair or the use of orthodontic devices and/or dental prostheses may favor microbial colonization of the mouth and dental biofilm accumulation (Dahllöf et al., 1989; Bokhout et al., 1996; Cheng et al., 2007b). In addition, the ingestion of tender foods during surgical and orthodontic treatment in CL/P patients, which may cause stagnation in the cicatrixes and fistulas, may increase the risk of caries (Cheng et al., 2007a).

Data from different populations indicate that CL/P subjects present more caries than did non-cleft individuals (Dahllöf et al., 1989; Besseling and Dubois, 2004; Kirchberg et al., 2004; Al-Wahadni et al., 2005; Cheng et al., 2007b; Stec-Slonicz et al., 2007; Mutarai et al., 2008; Al-Dajani, 2009; Zhu et al., 2010; Hazza'a et al., 2011). Other studies, however, reported dental conditions of the CL/P individuals to be similar to those of the general population (Lucas et al., 2000; Hewson, 2001; Lages et al., 2004; Parapanisiou et al., 2009). The lack of strong evidence for the assumption that cleft patients have an increased prevalence of dental caries may be

attributed to such factors as a small sample size, large age-range of the sample, and the absence of a control group in the studies (Hasslof and Twetman, 2007).

Despite the current global reduction in the incidence of dental caries, this condition remains high during adolescence (Jones et al., 2005; Pakpour et al., 2011). In addition, adolescence is marked by an increasing involvement in risk behaviors. It is a period of life when acquired and consolidated habits influence adult life (Pakpour et al., 2011). Most prevention and research efforts have been focused on the population under 12 years old.

There are few studies in the literature that compare caries experience in subjects with CL / P aged over 12 years with a matched noncleft group (Lucas, 2000; Hewson, 2001; Al-Wahadni, 2005; Cheng et al., 2007b; Parapanisiou et al., 2009; Al-Dajani, 2009; Zhu et al., 2010; Hazza'a et al., 2011). Therefore, the purpose of this study was to compare the caries experience of CL/P adolescents and young adults with a non-cleft control group to test the null hypothesis stating that the caries experience of CL/P subjects is similar to that of non-cleft individuals.

## Materials and Methods

### Research design

This is a cross-sectional controlled study in which a non-probabilistic sample of 30 CL/P subjects, aged 12-21 years, was screened between March and December 2010. The subjects were included in the group based on convenience and according to dental appointment attendance at the *Pro-Smile* Center, a reference center for the treatment of subjects with congenital or acquired craniofacial deformities (Unifenas Dental School, Alfenas, Minas Gerais, Brazil).

The following patients were excluded: those with syndromes associated with CL/P, those who used antimicrobial or immunosuppressive substances at least three months before the beginning of the study, and those with a mixed dentition (containing both deciduous and permanent teeth).

Data regarding the type of fissure, which was obtained from the clinical charts, were classified as the following: uni- or bilateral cleft lip involving and not involving the alveolar bone (CL  $\pm$  A), cleft palate (CP) involving the hard and/or soft palate, and uni- or bilateral cleft lip and palate (CLP).

As controls, 30 non-cleft individuals were selected from the General Dental Clinics of the same institution (Unifenas Dental School, Alfenas, Minas Gerais, Brazil). Exclusion criteria were similar to those in the CL/P subjects. To avoid selection bias, patients who had never undergone dental treatment were also excluded. Such biases are related to oral hygiene instruction and access to dental treatment once CL/P individuals receive health services, including oral care, after birth.

The objectives, significance, and methodology of research were explained, and an informed consent form was signed by all participants and their parents or legal representatives. This study was approved by the Institutional Review Board.

The CL/P subjects and the controls were matched according to gender, age, living habits and use or nonuse of orthodontic appliances.

For age, the match was made such that the difference between the pairs was not greater than two years, respective of the included age group (12 to 21 years).

The Medical Necessity Index (MNI) of the João Pinheiro Foundation (Minas Gerais, Brazil) and the Human Development Index (HDI) from the patients' cities of origin (Brazil, 2003) were used for matching "living habits". The MNI was taken from

the analysis of the epidemiological and socioeconomic information from each city in the state of Minas Gerais, Brazil, to promote an equitable allocation of the state financial resources.

A specific form was used to collect the following data: type of CL/P, age, gender, city of origin, family per capita income, contact with fluoride, hygiene habits, last visit to the dentist and mother's educational level.

Access to dental care refers to the last time the volunteer underwent dental treatment. Patients in both groups were undergoing dental treatment; therefore, the information was confirmed in the medical record after the volunteers answered the question.

Mother's educational-level data was converted into years of study for statistical analysis.

A 24-hour dietary recall diary was used to verify the patient's contact with cariogenic foods. With regard to per-capita income, the respondents were asked about the number of people living in the house, employment status of each person in the house and whether each person was retired or on a pension and the amount each person received per month. The total family income was divided by the number of people living in the house. Contact with fluoride was investigated by means of three distinct questions regarding the use of fluoridated toothpaste, fluoride rinse and fluoride tap water. The researchers also inquired about the frequency of toothbrushing and flossing.

Screening of the participants

Clinical examinations were conducted in a dental office using a plane mouth mirror and WHO (World Health Organization) model periodontal probe under standard operating illumination.

The dental surfaces were examined before and after being dried with air jets. The DMFT and DMFS indices were used, and the active caries lesions were noted (Ismail et al., 2005).

The visible plaque index was recorded according to Ainamo and Bay (1975). The bleeding on probing index was recorded after probing of the gingival sulcus on the vestibular and lingual surfaces, comprising mesial, middle, and distal sites (Muhleman and Son, 1971).

#### Examiner training

The screenings were conducted by a single examiner. Her training consisted of a theoretical discussion of criteria, codes and techniques of all the steps of the research. Six patients were reexamined at 7-day intervals after the first examination to evaluate the intra-examiner agreement. An excellent agreement was obtained with a weighted kappa value  $\geq 0.87$  (Landis and Koch, 1977).

#### Statistical analysis

The data were analyzed using the statistical program SPSS Statistics Data Editor 17.0 for Windows. McNemar's test was applied to compare the dichotomous variables within the paired groups. The paired t-test and Wilcoxon's test were used to compare normally and non-normally distributed quantitative variables, respectively. The significance level was 5%.

## Results

This study included 30 CL/P subjects and 30 matched controls: 11 (36.7%) males and 19 (63.3%) females in each group.

All of the participants in the subject group had already undergone surgical repair of the CL/P. Eighteen participants (60%) from each group wore orthodontic appliances. In the subject group, all were caries-active, and only 4 (13.33%) in the control group were caries-free (DMFT=0). The distribution of individuals according to cleft-type was the following: CLP = 43.3%, CL ± A = 36.7%, CP = 20.0%.

There were no statistically significant differences between the groups regarding oral hygiene habits, contact with fluoride, last visit to the dentist and mother's education level (Table 1).

Statistically significant differences were found between the subject and control groups for per capita income, active caries, decay component of the DMFS index, plaque index and gingival bleeding index (Table 2).

## Discussion

This cross-sectional controlled study showed that the caries experience of CL/P adolescents and young adults was higher than that in the non-cleft controls, thus rejecting the null hypothesis.

No CL/P subject in this study was caries-free. In the control group, 13.33% showed a DMFT of 0. This value was similar to that of the national survey carried out in Brazil in 2003, which found 11.06% of caries-free, 15-19-year-old adolescents (Ministério da Saúde, 2004). A higher prevalence of active lesions ( $p = 0.024$ ) and decayed surfaces ( $p = 0.040$ ) in the CL/P group compared with the control group was also observed. The greatest number of early caries lesions combined with poor

hygiene predisposed the CL/P group to an increased risk of developing cavitated lesions.

Different hypotheses have been advanced to explain the higher prevalence of caries in CL/P subjects (Zhu et al., 2010), such as the following: more care given to surgical repair of the cleft than to prevention and early treatment of caries (Al-Dajani, 2009), dry mouth caused by mouth breathing, ineffective dental self-cleaning, differences in dietary habits, tooth morphology (Wong and King, 1998), food remaining in the mouth for extended periods of time (Ahluwalia et al. 2004) and larger numbers of cariogenic bacteria in the mouths of CL/P individuals (Ahluwalia et al., 2004).

Matching can be considered a simple method to make subjects and controls comparable regarding important constitutional factors. In the present study, some factors that can confuse the caries experience (age, gender, living habits, and use of orthodontic appliances) were matched to avoid selection bias.

To avoid recall bias, questions were asked about recent information (24-hour dietary recall diary) during the interview, whereas data regarding cleft type and access to dental treatment were confirmed in the health record.

No differences in dietary habits were found between the subject and control groups. This finding is in accordance with the study by Zhu et al. (2010) that did not find differences in the frequency of cariogenic food consumption between 13-25-year-old CL/P and non-cleft subjects. The 24-hour dietary recall diary that was used is rapidly applied and does not interfere much with the individual's eating habits. A limitation of this instrument to be considered is the lower probability of obtaining reliable information regarding occasionally consumed foods (Voci et al., 2008).

A similarity between the groups was observed with hygiene habits and access to fluoride; this result is explained by matching the subjects for gender, age, living habits and use or non-use of orthodontic appliances. Most participants in both groups reported brushing their teeth at least three times a day with a fluoride dentifrice but did not routinely floss. Previous studies reported that the CL/P subjects and controls use a toothbrush and dentifrice, but most of them brush their teeth only once a day (Murthy et al., 2010, Pakpour et al., 2011) and never floss (Pakpour et al., 2011).

Although having reported brushing teeth at least three times a day, most participants presented high plaque index and gingival bleeding index. This means that the participants were not effectively removing biofilm. Plaque and gingival bleeding indices were statistically higher on CL/P subjects than controls. These findings confirm other studies that reported poorer oral hygiene for CL/P subjects when compared to non-cleft patients (Parapanisiou et al., 2009; Hazza'a et al., 2011). This was unexpected as both groups of patients are cared for at dental schools. It is possible that appropriate biofilm control by mechanical methods can be hindered by anatomical alterations in CL/P patients.

In this study, there was no difference between the subject and control groups regarding maternal education levels. Lower levels of maternal education have also been correlated with a higher caries index. Brazilian children whose mothers went to school for 8 years or less and whose family income was lower than 6 minimum wages were at greater risk for caries (Peres et al, 2003). In studies with CL/P children, it has also been observed that parents' education level has a positive effect on caries risk. Parents with more education seem to present more positive behavior concerning oral health and are more receptive to instructions given by healthcare



professionals, such as restrictions on sweets, oral hygiene, and routine dental consultations (Bokhout et al., 1996; Cheng et al., 2007a; Pakpour et al., 2011).

All of the subjects had already undergone surgery to repair the cleft. A recent study in 3-to-5-year-old patients reported that cleft surgeries cannot only repair anatomical defects but also positively affect oral health; they found that, once children had the lip and/or palate repaired, they maintained good oral hygiene and had fewer caries than did the non-cleft controls. However, this difference was not be found in older ages (6-12 and 13-25 years); this difference is probably because other hygiene habits besides surgical repair can affect the caries observed in adolescents and young adults (Zhu et al., 2010).

In spite of matching groups for “living habits” using a Medical Necessity Index and the Human Development Index, a significantly lower per capita income was found for the CL/P group compared with the control group. Although it is well known that increased incidence of caries is associated with poverty, the importance of the CL/P-related factors for the occurrence of caries is highlighted by studies reporting a higher caries prevalence in CL/P subjects even when their socioeconomic statuses were similar to that of the control groups (Hasslof and Twetman, 2007; Al-Dajani, 2009; Zhu et al., 2010).

Subjects with CL/P undergoing orthodontic treatment tended to present microbiology and salivary profiles that were less favorable for the development of caries (Cheng et al., 2007b). Although verifying the influence of orthodontic devices in the caries experience was not our purpose, 60% of each group wore orthodontic appliances. Intensive preventive measures are needed for these patients to optimize clinical results (Cheng et al., 2007a; Parapanisiou et al., 2009; Hazza'a et al., 2011)

Clinical and epidemiological studies on CL/P subjects are important because of the prevalence of these malformations and the impact of rehabilitation treatment on the public health system, which require specialized centers. These studies can estimate the risk of oral diseases in CL/P subjects and plan strategies for the prevention and early diagnosis of caries. The final goal is to reduce the disease burden on this functionally and aesthetically compromised population.

## References

- Ahluwalia M, Brailsford SR, Tarelli E, Gilbert SC, Clark DT, Barnard K, Beighton D. Dental caries, oral hygiene, and oral clearance in children with craniofacial disorders. *J Dent Res.* 2004;83:175–9.
- Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975;25:229-35.
- Al-Dajani M. Comparison of dental caries prevalence in patients with cleft lip and/or palate and their sibling controls. *Cleft Palate Craniofac J.* 2009;46(5):529-31.
- Al-Wahadni A, Alhajja EA, Al-Omari MA. Oral disease status of a sample of Jordanian people ages 10 to 28 with cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2005;42(3):304-8.
- Arce B, Azevedo JB, Freire-Maia N, Chautard EA. Incidence and recurrence risks of labiopalatine clefts. *Rev Paul Med.* 1968;72(5):239-46.
- Besseling S, Dubois L. The prevalence of caries in children with a cleft lip and/or palate in Southern Vietnam. *Cleft Palate Craniofac J.* 2004;41(6):629-32.
- Bokhout B, Van Loveren C, Hofman FXWM, Buijs JF, Van Limbeek J, Prahl Andersen B. Prevalence of streptococcus mutans and lactobacilli in 18-month old children with cleft lip and/or palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 1996;33(5):424-8.

- Brasil. Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil – versão 1.0.0, PNUD, IPEA, Fundação João Pinheiro PNUD, 2003. Available at: <http://www.pnud.org.br/atlas>. Accessed August 25, 2009.
- Cheng LL, Moor SL, Ho CT. Predisposing factors to dental caries in children with cleft lip and palate: a review and strategies for early prevention. *Cleft Palate Craniofac J*. 2007a;44(1):67-72.
- Cheng LL, Moor SL, Kravchuk O, Meyers IA, Ho CT. Bacteria and salivary profile of adolescents with and without cleft lip and/or palate undergoing orthodontic treatment. *Aust Dent J*. 2007b;52(4):315-21.
- Dahllöf G, Ussisoo-Joandi R, Ideberg M, Modeer T. Caries, gingivitis, and dental abnormalities in preschool children with cleft lip and/or palate. *Cleft Palate J*. 1989;26:233–8.
- Hasslof P, Twetman S. Caries prevalence in children with cleft lip and palate — a systematic review of case–control studies. *Int J Paediatr Dent*. 2007;17:313-9.
- Hazza'a A, Rawashdeh M, Al-Nimri K, Al Habashneh R. Dental and oral hygiene status in Jordanian children with cleft lip and palate: a comparison between unilateral and bilateral clefts. *Int J Dent Hyg*. 2011;9(1):30-6.
- Hewson AR, McNamara CM, Foley XF, Sandy JR. Dental experience of cleft affected children in the west of Ireland. *Int Dent J* 2001;51:73-6.
- Ismail AI, coordinating ICDAS committee (2005). Rationale and evidence for the international caries detection and assessment system (ICDAS II) in: Stookey G (ed) Proceedings of the 7th Indiana Conference, Indianapolis, Indiana p 161-222.
- Jones S, Burt BA, Petersen PE, Lennon MA. The effective use of fluorides in public health. *Bull World Health Organ*. 2005;83:670-6.

- Kirchberg A, Treide A, Hemprich A. Investigation of caries prevalence in children with cleft lip, alveolus, and palate. *J Craniomaxillofac Surg.* 2004 Aug;32(4):216-9.
- Lages EM, Marcos B, Pordeus IA. Oral health of individuals with cleft lip, cleft palate, or both. *Cleft Palate Craniofac J.* 2004;41(1):59-63.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33:159-74.
- Lucas V, Gupta R, Ololade O, Gelbier M, Roberts G. Dental health indices and caries associated microflora in children with unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J* 2000;37:447-452.
- Martelli-Junior H, Orsi JJ, Chaves MR, Barros LM, Bonan PRF, Freitas JAS. Epidemiologic study of cleft lip and palate in Alfenas - Minas Gerais - from 1986 to 1998. *RPG rev. pos-grad.* 2006;13:31-35.
- Minas Gerais. Secretaria de Estado de Saúde. Metodologia de alocação equitativa de recursos: uma proposta para Minas Gerais. / Mônica Viegas Andrade et al. Belo Horizonte: 2004. Available at:  
[http://www.cedeplar.ufmg.br/seminarios/seminario\\_diamantina/2006/D06A045.pdf](http://www.cedeplar.ufmg.br/seminarios/seminario_diamantina/2006/D06A045.pdf).  
Accessed August 25, 2009
- Ministério da Saúde, Departamento de Atenção Básica, Secretaria de Atenção à Saúde, Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2003. Condições de saúde bucal da população brasileira, 2002-2003: resultados principais. Brasília; 2004. Available at:  
[http://cfo.org.br/wp-content/uploads/2009/10/04\\_0347\\_M.pdf](http://cfo.org.br/wp-content/uploads/2009/10/04_0347_M.pdf). Accessed August 25, 2009.
- Muhleman H, Son S. Gingival sulcus index. A leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta.* 1971;42:195-209.

- Murthy S, Rani DJ, Diwakar S, Vernekar NV, Lodaya R. Prevalence of dental caries and oral hygiene practices in children with cleft lip and/or palate. *Int Journal of Contemporary Dentistry*. 2010;1(3):12-7.
- Mutarai T, Ritthagol W, Hunsrisakhun J. Factors influencing early childhood caries of cleft lip and/or palate children aged 18 to 36 months in southern Thailand. *Cleft Palate Craniofac J*. 2008 Sep;45(5):468-72.
- Nagem Filho H, Moraes N, Rocha RGF. Contribuição para o estudo da prevalência das más formações congênitas lábio-palatais na população escolar de Bauru. *Rev Fac Odont S Paulo* 1968;6(2):111-28.
- Nunes LMN, Queluz DP, Pereira AC. Prevalence of oral cleft in Campos dos Goytacazes-RJ, 1999-2004. *Rev Bras Epidemiol*. 2007;10(1):109-16.
- Pakpour AH, Hidarnia A, Hajizadeh E, Kumar S, Harrison AP. The status of dental caries and related factors in a sample of Iranian adolescents. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Jan 3. [Epub ahead of print]  
<http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/aop/17074.pdf>
- Parapanisiou V, Gizani S, Makou M, Papagiannoulis L. Oral health status and behaviour of Greek patients with cleft lip and palate. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2009;10(2):85-9.
- Peres MA, Latorre MRDO, Sheiham A, Peres KG, Barros FC, Hernandez PG, Maas AMN, Romano AR, Victora CG. Effects of social and biological factors on dental caries in 6-year-old children: a cross sectional study nested in a birth cohort in Southern Brazil. *Rev Bras Epidemiol*. 2003;6(4):293-306.
- Stec-Slonicz M, Szczepańska J, Hirschfelder U. Comparison of caries prevalence in two populations of cleft patients. *Cleft Palate Craniofac J*. 2007;44(5):532-7.

Voci SM, Enes CC, Slater B. Validation of a Food Frequency Questionnaire by food groups for the adolescent population. *Rev Bras Epidemiol.* 2008;11(4): 561-72.

Wong FW, King NM. The oral health of children with clefts-a review. *Cleft Palate Craniofac J.* 1998;35:248–254.

Zhu WC, Xiao J, Liu Y, Wu J, Li JY. Caries experience in individuals with cleft lip and/or palate in China. *Cleft Palate Craniofac J.* 2010;47(1):43-7.

Table 1: Comparison of subject and control groups regarding oral hygiene habits, contact with fluoride, mother's education level and last visit to the dentist.

Variables	Subject		Control		p
	N	%	N	%	
Brushing frequency/day					
< 3	6	20	9	30	0.5520
≥ 3	24	80	21	70	
Dental floss					
No	20	66.7	17	56.7	0.596
Yes	10	33.3	13	43.3	
Fluoridated Paste					
No	0	0	1	3.3	1.000
Yes	30	100	29	96.7	
Mouth rinse					
No	27	90	24	80	0.4712
Yes	3	10	6	20	
Fluoridated water					
No	9	30	3	10	0.104
Yes	21	70	27	90	
Mother's education level (years)					
≤ 4	20	66.7	16	53.3	0.081
> 4	5	16.7	12	40	
Last visit to the dentist (days)					
> 30	7	23.3	6	20	0.754
≤ 30	23	76.7	24	80	

Table 2: Comparison of subject and control groups regarding variables of interest.

Variables	Subject	Control	Sig.	95% Confidence Interval of the Difference
	Mean (Std. Deviation)			
Per capita income (US\$)*	159.27 (121.55)	342.84 (314.27)	0.007	-499.43 / -86.17
DMFT Index	8.20 (4.51)	7.17 (5.34)	0.498	-2.043/4.110
Decayed teeth	1.40 (2.14)	0.60 (1.16)	0.105	-0.178/1.778
Missing teeth	0.27 (0.69)	0.10 (0.40)	0.283	-0.145/0.478
Filled teeth	6.53 (3.55)	6.47 (4.90)	0.960	-2.608/2.741
DMFS index	10.83 (6.60)	8.77 (8.15)	0.356	-2.439/6.572
Decayed surfaces*	1.60 (2.28)	0.60 (1.16)	0.040	0.049 / 1.951
Missing surfaces	1.33 (3.46)	0.50 (2.01)	0.283	-0.724/2.390
Filled surfaces	7.90 (4.43)	7.67 (7.14)	0.899	-3.507/3.973
Active caries *	5.68 (9.37)	1.60 (1.70)	0.024	0.57 / 7.59
Visible plaque index *	75.60 (22.08)	50.09 (24.71)	0.000	14.64 / 36.37
Gingival Bleeding Index *	57.03 (21.66)	39.76 (16.79)	0.002	6.73 / 27.82
Daily contact with sucrose	6.40 (3.49)	5.80 (2.31)	0.397	-0.826/2.026

\*Statistically significant difference between groups



## *Artículo 2*

Cárie dentária, fatores ambientais e presença de estreptococos do grupo mutans em jovens com fissura lábio-palatina

Amanda Beatriz Dahdah Aniceto Freitas, Doutoranda em Clínica Odontológica, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

Letícia Monteiro de Barros, Professora Associada do Curso de Odontologia da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Brasil.

João Evangelista Fiorini, Professor Associado da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Brasil.

Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, Professor Associado da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Brasil.

Allyson Nogueira Moreira, Professor Associado do Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

Claudia Silami Magalhães, Professora Associada do Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

Autora correspondente:

Claudia Silami Magalhães

Rua Ludgero Dolabela 139, apto 301 Belo Horizonte, MG, Brasil

30430-130

E-mail: [silamics@yahoo.com](mailto:silamics@yahoo.com)

Este estudo teve suporte da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - APQ-00523-09).

## Resumo

Este estudo transversal controlado buscou associação entre experiência de cárie dentária, fatores ambientais e presença de estreptococos do grupo mutans em adolescentes e adultos jovens com fissura lábio-palatina (FL/P). Foram incluídos 30 pacientes com FL/P (grupo caso) e 30 sem FL/P (grupo controle), com 12 a 21 anos idade, pareados por gênero, idade, condições de vida e utilização de dispositivo ortodôntico. Foram coletadas informações sobre: renda familiar *per capita*, contato com fluoretos, hábitos de higiene, acesso ao tratamento odontológico, escolaridade materna e contato com sacarose. Os índices de placa visível, CPOD e CPOS, e as lesões de cárie ativa foram registrados. Foi coletado biofilme supra-gengival do qual foram isolados e identificados *S. mutans* e de *S. Sobrinus* por PCR. Os grupos caso e controle foram comparados quanto à presença de estreptococos do grupo mutans. A associação entre as variáveis foi verificada por meio de análise multivariada por regressão logística *backward stepwise conditional* ( $p \leq 0,05$ ). Foi observada presença de *S. mutans* em 83,34% e 86,67% das amostras de biofilme dos grupos caso e controle, respectivamente. O *S. sobrinus* estava presente em 6,66% das amostras de biofilme do grupo caso e em 10% do grupo controle. Não houve associação entre a presença de *S. mutans* ou de *S. sobrinus* e experiência de cárie. A presença de FL/P apresentou-se associada à cárie quando esta foi medida pelo CPOS. O uso de aparelho ortodôntico mostrou associação positiva com experiência de cárie medida por CPOD, CPOS, componente restaurado do CPOD e CPOS. Os fatores ambientais mostraram-se mais importantes na determinação da experiência de cárie que os fatores biológicos estudados.

Palavras-chave: cárie, CPOD, PCR, *S. mutans*, *S. sobrinus*, fissura lábio-palatal

## Introdução

Uma revisão sistemática verificou se a presença de fissuras lábio-palatinas (FL/P) interferia na prevalência de cárie em crianças. Dentre os estudos elegíveis, dois de quatro estudos com dentição permanente e três de quatro estudos com dentes decíduos mostraram maior prevalência de cárie em crianças com FL/P. Demonstrou-se clara tendência para maior prevalência de cárie nos dentes decíduos de crianças que têm FL/P apesar da qualidade baixa a moderada dos estudos elegíveis (Hasslof; Twetman, 2007).

Com exceção do estudo de Cheng *et al.* 2007, a literatura publicada a partir de 2006 e analisada pelos mesmos critérios definidos por Hasslof & Twetman (2007) para classificação da evidência mostrou que a prevalência de cárie em pacientes com FL/P foi maior que nos indivíduos sem FL/P (Stec-Slonicz *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2007; Mutarai *et al.*, 2008; Parapanisiou *et al.*, 2009; Al-Dajani, 2009; Zhu *et al.*, 2010; Britton, Welbury, 2010; Hazza'a *et al.*, 2011). No entanto, exceto pela revisão sistemática (Hasslof; Twetman, 2007), foi encontrada evidência baixa a moderada dos estudos elegíveis e evidente necessidade de melhorar a qualidade das pesquisas nesta área, a fim de formular diretrizes de tratamento baseadas em evidências científicas sólidas.

Diferentes hipóteses tentam explicar a maior prevalência de cárie em indivíduos com FL/P (Zhu *et al.*, 2010), incluindo: maior atenção dada à correção cirúrgica da fissura que à prevenção e tratamento precoce da cárie (Al-Dajani, 2009); boca seca causada por hábitos de respiração bucal; auto limpeza deficiente dos dentes; diferença nos hábitos de dieta (Besseling; Dubois, 2004); morfologia dos dentes (Wong; King, 1998); aumento do tempo de permanência dos alimentos na boca e maior número de bactérias cariogênicas na cavidade bucal em indivíduos com fissura (Ahluwalia *et al.*, 2004).

A cárie é uma doença induzida por biofilme, causada pela perda do equilíbrio na fisiologia entre o mineral do dente e o fluido do biofilme. É uma doença presente em todas as populações, porém, com taxa de incidência bastante variável dentro e entre populações (Fejerskov, 2004). Numerosos fatores, como quantidade e qualidade da saliva, hábitos alimentares, composição do biofilme, hábitos de higiene bucal entre outros, podem influenciar o resultado da doença (Fejerskov, 2004; Narvai *et al.*, 2006).

Estudos epidemiológicos têm relatado a ocorrência de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* na cavidade bucal humana, sendo que a frequência de isolamento de *S. mutans* na placa dental é maior do que a de *S. sobrinus* (Napimoga *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2010). Indivíduos colonizados por *S. mutans* e *S. sobrinus* tendem a apresentar maior prevalência de cárie que aqueles colonizados apenas por *S. mutans* (Nurelhuda *et al.*, 2010).

Além da tolerância e produção de ácidos, os estreptococos do grupo mutans possuem capacidade de responder às pressões ambientais como fluxo salivar, pH ácido, estresse

oxidativo e alterações na fonte e disponibilidade de carboidratos. Ainda possuem capacidade de sobrevivência no biofilme dental devido à alta capacidade de adaptação ao ambiente, presença de adesinas na superfície celular, produção de glicosiltransferases, mutacina, polissacarídeos extracelulares e atividade proteolítica, capaz de degradar colágeno dos substratos (Jackson *et al.*, 1997; Smith; Spatafora, 2011).

Este estudo se justifica, pois estudos sobre a experiência de cárie em adolescentes e adultos jovens com FP/L são escassos e os existentes são considerados de fraca evidência científica (Hasslof; Twetman, 2007). O conhecimento sobre a composição da microbiota bucal pode auxiliar na determinação do risco individual à cárie dentária (Nurelhuda *et al.*, 2010).

O objetivo deste estudo foi verificar a associação entre a experiência de cárie, a presença de estreptococos do grupo mutans e variáveis ambientais envolvidas no processo de cárie, em adolescentes e adultos jovens com fissura lábio-palatina e um grupo controle sem fissura.

## Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa das Instituições envolvidas (ETIC 3297/09 - UFMG e 167/2008 – UNIFENAS) e todos os voluntários e representantes legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este é um estudo transversal controlado no qual uma amostra não probabilística de 30 pacientes com FL/P (grupo caso) e 30 sem FL/P (grupo controle), com idade entre 12 e 21 anos, foram examinados entre março e dezembro de 2010.

Foram excluídos indivíduos com síndromes associadas à FL/P; que tivessem feito uso de antimicrobianos ou imunossupressores há pelo menos três meses do início do estudo e pacientes com dentadura mista. Para o grupo controle, também foram excluídos indivíduos que nunca haviam recebido tratamento odontológico, para se evitar o viés de seleção. Este viés estaria relacionado à instrução de higiene bucal e acesso ao tratamento odontológico, pois, no Brasil, a maioria dos indivíduos com FL/P, normalmente, frequentam serviços de saúde, inclusive odontológicos, desde o nascimento.

Os indivíduos dos grupos Caso e Controle foram pareados de acordo com gênero, idade, condições de vida e utilização ou não de dispositivo ortodôntico.

Para a idade foi feito pareamento a fim de que houvesse no máximo dois anos de diferença entre os pares, dentro da idade estabelecida nos critérios de inclusão.

No pareamento de “condições de vida” foram utilizados o Índice de Necessidade em Saúde (INS) da Fundação João Pinheiro (Minas Gerais, 2004) e o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do município de origem do indivíduo (Brasil, 2003).

Foram coletadas informações sobre: tipo de FL/P, idade, gênero, município de origem, renda familiar *per capita*, contato com fluoretos, hábitos de higiene, última visita ao dentista e escolaridade materna. Foi aplicado um diário dietético recordatório de 24 horas, para verificar o contato do paciente com alimentos cariogênicos.

A informação sobre renda *per capita* foi obtida dividindo-se a renda total da família pelo número de moradores da residência. O contato com fluoretos foi investigado por meio de três questões: utilização de dentifrício e de bochechos fluoretados e abastecimento de água tratada na residência. Para o relato dos hábitos de higiene oral, perguntou-se a frequência de escovação dentária e do uso de fio dental. O acesso ao tratamento odontológico referiu-se à última vez que o voluntário havia feito tratamento odontológico. Para fins de análise estatística, o grau de instrução materno foi convertido em anos de estudo.

Foi coletado biofilme supra-gengival com *swab* estéril de 5 dentes: um molar (definido por sorteio) e quatro dentes adjacentes à área da fissura. Nos indivíduos do grupo controle, o biofilme foi coletado dos mesmos dentes dos indivíduos do grupo controle, seguindo o pareamento. Para a coleta, a ponta de algodão foi friccionada por 10 segundos em cada dente.

Cada *swab* foi inserido, separadamente, em microtubos contendo 500  $\mu$ L de salina estéril, e encaminhado ao laboratório onde se prosseguiram as etapas de isolamento e identificação dos microrganismos.

Os exames clínicos dos pacientes foram realizados, após profilaxia profissional, com espelho clínico plano e sonda especial modelo OMS, sob iluminação de refletor. Foram registrados os índices de placa visível (IPV), CPOD e CPOS, e registradas as lesões ativas de cárie. Um único examinador treinado ( $k_w=0,87$ ) realizou os exames.

Visando a obtenção de uma suspensão uniforme do biofilme coletado, as amostras foram submetidas a 60 segundos de agitação, e posteriormente foram diluídas em série decimal ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ), em solução salina 0,9%. Alíquotas de 100 $\mu$ L de cada diluição foram inoculadas em meio ágar *Mitis Salivarius* com bacitracina 200 U/L, 15% de sacarose e 1% de telurito de potássio.

Havendo crescimento positivo, após a incubação a 37° C por 48 horas, foram isoladas 10 colônias que apresentassem morfologia colonial e celular típica de estreptococos, e com resultado negativo na prova de produção de enzima catalase.

Após subcultivo e confirmação de pureza através de coloração pelo método de Gram, alíquotas de 1mL do subcultivo foram criopreservadas em duplicata em BHI-Glicerol 20%.

Para obtenção do DNA bacteriano, os isolados foram reativados em 20 mL caldo BHI e incubados a 37°C por 24 h. Após o crescimento bacteriano, as células foram centrifugadas a 6.000 rpm por 2 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado com 5 mL de tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0). Após agitação, nova

centrifugação nas mesmas condições, e descarte do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 2 mL de tampão TE pH 8,0. Neste momento a solução resultante foi transferida para um tubo para microcentrífuga, e centrifugada a 7.500 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células submetidas ao processo de extração do DNA (Doyle; Doyle, 1987).

A concentração de DNA foi calculada medindo a absorbância a 260nm.

As amostras de DNA foram submetidas à PCR para a identificação molecular de *S. mutans* e de *S. sobrinus* (Oho *et al.*, 2000; Napimoga *et al.*, 2004), com a utilização de pares *primers* específicos (Tabela 1) para a porção do gene correspondente à glicosiltransferase (*gtfB* de *S. mutans*, *gtfI* de *S. sobrinus*)

#### TABELA 1

Os amplicons foram analisados por eletroforese, em gel de agarose 1,8% em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA, pH 8,0).

Em cada gel foi incluído um padrão de peso molecular de 1kb. Após a corrida eletroforética (75 volts por 2 horas), as bandas de DNA foram coradas com solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) por 15 minutos, visualizadas em transluminador de luz ultravioleta e analisadas.

Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico SPSS Statistics Data Editor 17.0 for Windows, adotando-se nível de significância de 5%. Realizou-se comparação entre os grupos para a prevalência dos estreptococos do grupo mutans (teste de McNemar). A associação entre a experiência de cárie (expressa por CPOD e componentes, CPOS e componentes, e lesões ativas de cárie) e as variáveis independentes (presença de fissura, contato com fluoretos, hábitos de higiene, escolaridade materna, renda *per capita*, utilização de aparelho ortodôntico, última visita ao dentista, contato com sacarose, IPV e presença de estreptococos do grupo mutans) foi verificada por meio de análise univariada e multivariada por regressão logística *backward stepwise conditional* ( $p \leq 0,05$ ).

As variáveis contínuas foram dicotomizadas pela média e as ordinais pela mediana. O índice de placa visível foi dicotomizado usando o ponto de corte de 30% de superfícies com biofilme (Lindhe, 2005).

As covariáveis que apresentaram  $p < 0,25$  nas análises univariadas foram adicionadas ao modelo multivariado. Em todos os modelos multivariados, a presença de fissura foi adicionada devido à sua importância para o estudo.

## Resultados

Foi observada presença de *S. mutans* em 83,34% das amostras de biofilme dos indivíduos do grupo caso e em 86,67% das do grupo controle. O *S. sobrinus* estava presente em 6,66% das mostras de biofilme do grupo caso e em 10% no grupo controle, em ambos, sempre associado à presença do *S. mutans*. Não houve diferença entre os grupos quanto à presença de ambos os microrganismos ( $p>0,05$ ).

No grupo caso, de todas as colônias isoladas ( $n= 600 / 10$  colônias por paciente) com características sugestivas de estreptococos do grupo mutans, 27,6% foram identificadas por PCR como *S. mutans* e 1,33% como *S. sobrinus*. No grupo controle, 25,6% das colônias foram identificadas como *S. mutans* e 1,33% como *S. sobrinus*.

A Tabela 2 mostra o resultado das análises univariadas cujas associações entre a variável dependente e as independentes apresentaram  $p<0,25$ . Na Tabela 3 estão os resultados da análise multivariada para cada expressão da variável dependente.

TABELA 2

TABELA 3

Discussão

Este estudo transversal controlado mostrou que os fatores ambientais, tais como presença de FL/P, utilização de aparatos ortodônticos, escolaridade da mãe, hábitos de higiene e contato com fluoretos foram mais importantes na determinação da experiência de cárie que os fatores biológicos estudados.

Neste estudo, o pareamento foi realizado por idade, gênero, condições de vida e utilização de aparelho ortodôntico, fatores que poderiam ser considerados confundidores para a experiência de cárie; uma vez que estudos mostram associação destes fatores e a experiência de cárie (Narvai *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2007; Pakpour *et al.*, 2011).

A associação significativa entre o índice CPOS e a presença de FL/P, demonstrada no presente estudo, está de acordo com estudos anteriores com delineamento similar, nos quais também foi observada experiência de cárie significativamente maior em indivíduos com FL/P que em seus controles em diversas faixas etárias (Besseling; Dubois, 2004; Ahluwalia *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2010; Hazza'a *et al.*, 2011), mesmo quando as condições sócio-econômicas eram semelhantes (Al-Dajani, 2009; Zhu *et al.* 2010).

O grau de instrução materna mostrou-se associado ao componente restaurado do índice CPOD. O componente restaurado pode ter representado de forma mais evidente a experiência de cárie nesta amostra de indivíduos com acesso regular ao tratamento



odontológico. No Brasil, já foi observado que crianças cujas mães estudaram 8 anos ou menos e cuja renda familiar foi menor que 6 salários mínimos tiveram maior risco de apresentar cárie (Peres *et al.*, 2003). Em estudos com crianças com FL/P já foi observado que o nível de educação dos pais tem um efeito sobre a incidência de cárie. Pais mais instruídos parecem apresentar um comportamento mais positivo para saúde bucal, seguindo melhor as orientações recebidas pelos profissionais de saúde, com maior atenção para restrição de alimentos doces, higiene bucal e consultas odontológicas de rotina. (Cheng *et al.*, 2007; Pakpour *et al.*, 2011).

A utilização de fio dental e de bochecho fluoretado apresentou associação negativa com a variável desfecho cárie ativa, o que reforça a idéia de controle do biofilme para reduzir risco de cárie. Em todos os níveis, seja individual ou coletivo, os fatores biológicos relacionados à cárie dentária são altamente influenciados pelas condições comportamentais e sócio-econômicas (Fejerskov, 2004; Narvai *et al.*, 2006).

No Brasil, pessoas com a incidência aumentada da doença e que geralmente não têm acesso ao flúor ou a programas preventivos de saúde bucal, num ambiente de baixo nível educacional, constituem os chamados grupos de alto risco, que concentram altos níveis de cárie dentária, polarizando a distribuição da doença (Peres *et al.*, 2003).

A necessidade de medidas preventivas intensivas para o controle das doenças bucais em indivíduos com FL/P deve ser enfatizada (Cheng *et al.*, 2007; Parapanisiou *et al.*, 2009; Hazza'a *et al.*, 2011), principalmente porque a maioria dos pacientes na faixa etária estudada faz uso de dispositivo ortodôntico, o qual dificulta sobremaneira o controle do biofilme. O uso de aparelho ortodôntico mostrou associação positiva com CPOD, CPOS, componente restaurado do CPOD e do CPOS. Portanto, indivíduos que fazem uso destes aparatos devem ser supervisionados com maior periodicidade, principalmente aqueles com FL/P. Indivíduos com FL/P usando aparelho ortodôntico e submetidos a medidas de promoção de saúde apresentaram perfis microbiológicos e salivares mais favoráveis ao controle da cárie que aqueles, com ou sem FL/P, que não participaram do programa de promoção de saúde (Cheng *et al.*, 2007).

Quanto à presença de *S. mutans* e *S. sobrinus* na população estudada, não foi observada diferença entre os grupos caso e controle. O *S. mutans* tem sido encontrado em praticamente todos os indivíduos incluindo aqueles que apresentam desde alta, média, até baixa prevalência de cárie (Fejerskov, 2004), porém a simples detecção destes microrganismos na saliva ou placa dental não justifica o desenvolvimento da doença. A epidemiologia da cárie dentária é influenciada pelas condições sócio-econômicas-culturais e ambientais da população além da presença de *S. mutans* (Mattos-Graner *et al.*, 2001; Fejerskov, 2004; Narvai *et al.*, 2006).

A identificação de *S. mutans* e *S. sobrinus* revelou que de todas as colônias isoladas com características sugestivas de estreptococos do grupo mutans, de indivíduos com FL/P, 27,6% foram identificadas como *S. mutans* e 1,33% como *S. sobrinus*. No grupo controle, 25,6% das colônias foram identificadas como *S. mutans* e 1,33% como *S. sobrinus*. Resultados semelhantes já foram observados num estudo utilizando o meio ágar Mitis Salivarius acrescido de bacitracina, para isolar microrganismos. De um total de 21 colônias típicas analisadas, 12 não pertenciam ao grupo mutans, sendo identificadas por provas bioquímicas e moleculares como *S. anginosus*, *S. sanguis* e *Pantoea agglomerans* (Yoo *et al.*, 2005). Desta forma, os resultados sugerem a necessidade de padronização de critérios associados ao meio seletivo para isolamento dos estreptococos do grupo mutans.

Foi observada presença de *S. mutans* em 83,34% das amostras de biofilme dos indivíduos do grupo caso e em 86,67% das do grupo controle. O *S. sobrinus* estava presente em 6,66% das mostras de biofilme do grupo caso e em 10% no grupo controle, em ambos, sempre associado à presença do *S. mutans*. Estes superam resultados anteriores em que *S. mutans* foi detectado em 67,3% por qPCR e em apenas 38,8% por PCR padrão das amostras de placa supra-gengival (Psoter *et al.*, 2010). Este fato pode estar associado a diferenças metodológicas. Neste estudo, as colônias foram isoladas, subcultivadas e uma grande massa celular foi obtida para os procedimentos de extração de DNA e identificação por PCR. Apesar dos métodos moleculares mais modernos como a qPCR serem mais sensíveis (Psoter *et al.*, 2010), PCR padrão pode ser utilizada para identificação dos microrganismos em estudos epidemiológicos.

Os dados deste estudo fornecem base para os parâmetros de saúde bucal em pacientes com FL/P e reforçam a necessidade da implementação de programas de motivação e educação em relação à higiene bucal com métodos simples e eficientes para remoção do biofilme dental.

#### Referências Bibliográficas

Ahluwalia M, Brailsford SR, Tarelli E, Gilbert SC, Clark DT, Barnard K, Beighton D. Dental caries, oral hygiene, and oral clearance in children with craniofacial disorders. *J Dent Res.* 2004;83:175–179.

Al-Dajani M. Comparison of dental caries prevalence in patients with cleft lip and/or palate and their sibling controls. *Cleft Palate Craniofac J.* 2009;46(5):529-31.

Besseling S, Dubois L. The prevalence of caries in children with a cleft lip and/or palate in Southern Vietnam. *Cleft Palate Craniofac J.* 2004;41(6):629-32.

Brasil. Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil – versão 1.0.0, PNUD, IPEA, Fundação João Pinheiro PNUD, 2003. Disponível em <http://www.pnud.org.br/atlas>, acesso em 25/08/2009.

Britton KF, Welbury RR. Dental caries prevalence in children with cleft lip/palate aged between 6 months and 6 years in the West of Scotland. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2010;11(5):236-41.

Cheng LL, Moor SL, Kravchuk O, Meyers IA, Ho CT. Bacteria and salivary profile of adolescents with and without cleft lip and/or palate undergoing orthodontic treatment. *Aust Dent J*. 2007;52(4):315-21.

Doyle JJ, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987;191:11-5, 1987.

Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res*. 2004; 38:182-191.

Hasslof P, Twetman S. Caries prevalence in children with cleft lip and palate — a systematic review of case–control studies. *Int J Paediatr Dent*. 2007; 17:313–319.

Hazza'a A, Rawashdeh M, Al-Nimri K, Al Habashneh R. Dental and oral hygiene status in Jordanian children with cleft lip and palate: a comparison between unilateral and bilateral clefts. *Int J Dent Hyg*. 2011;9(1):30-6.

Jackson RJ, Lim DV, Dao ML. Identification and analysis of a collagenolytic activity in *Streptococcus mutans*. *Current Microbiology* 1997; 34:49-54.

Lindhe J. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005. 1013p.

Mattos-Graner RO, LI Y, Caufield PW, Duncan M, Smith DJ. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:2313-6.

Minas Gerais. Secretaria de Estado de Saúde. Metodologia de alocação equitativa de recursos: uma proposta para Minas Gerais. / Mônica Viegas Andrade et al. Belo Horizonte: 2004.

Mutarai T, Ritthagol W, Hunsrisakhun J. Factors influencing early childhood caries of cleft lip and/or palate children aged 18 to 36 months in southern Thailand. *Cleft Palate Craniofac J*. 2008 Sep;45(5):468-72.

Napimoga MH, Kamiya RU, Rosa RT, Rosa EAR, Höfling JF, Mattos-Graner RO, Gonçalves RB. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries active individuals. *J Med Microbiol*. 2004; 53: 697–703.

Narvai PC, Frazão P, Roncalli AG, Antunes JLF. Dental caries in Brazil: decline, polarization, inequality and social exclusion. *Pan Am J Public Health*. 2006;19(6):385–93.

Nurelhuda NM, Al-Haroni M, Trovik TA, Bakken V. Caries experience and quantification of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva of Sudanese schoolchildren. *Caries Res*. 2010;44(4):402-7.

Oho T; Yamashita Y; Shimazaki Y; Kushiya M; Koga T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by Polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2000; 15(4):258-262.

Pakpour AH, Hidarnia A, Hajizadeh E, Kumar S, Harrison AP. The status of dental caries and related factors in a sample of Iranian adolescents. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Jan 3. [Epub ahead of print] Disponível em: <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/aop/17074.pdf>

Palmer CA, Kent R Jr, Loo CY, Hughes CV, Stutius E, Pradhan N, Dahlan M, Kanasi E, Arevalo Vasquez SS, Tanner AC. Diet and caries-associated bacteria in severe early childhood caries. *J Dent Res*. 2010 Nov;89(11):1224-9.

Parapanisiou V, Gizani S, Makou M, Papagiannoulis L. Oral health status and behaviour of Greek patients with cleft lip and palate. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2009;10(2):85-9.

Peres MA, Latorre MRDO, Sheiham A, Peres KG, Barros FC, Hernandez PG, Maas AMN, Romano AR, Victora CG. Effects of social and biological factors on dental caries in 6-year-old children: a cross sectional study nested in a birth cohort in Southern Brazil *Rev Bras Epidemiol*. 2003;6(4): 293-306.

Psoter WJ, Ge Y, Russell SL, Chen Z, Katz RV, Jean-Charles G, Li Y. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in dental plaque samples from Haitian adolescents. *Clin Oral Investig*. 2010; 15(4):461-9.

Smith G, Spatafora GA. Gene regulation in *S. mutans*: Complex control in a complex environment. *J Dent Res*. July 8, 2011 0022034511415415, first published on July 8, 2011 doi:10.1177/0022034511415415.

Stec-Slonicz M, Szczepańska J, Hirschfelder U. Comparison of caries prevalence in two populations of cleft patients. *Cleft Palate Craniofac J*. 2007;44(5):532-7.

Wong FW, King NM. The oral health of children with clefts—a review. *Cleft Palate Craniofac J*. 1998;35:248–254.

Yoo SY, Kim PS, Hwang H K, Lim SH, Kim KW, Choe SJ, Min BM, Kook JK. Identification of non mutans streptococci organisms in dental plaques recovering on mitissalivarius bacitracin agar medium. *J. Microbiol*. 2005;43:204-8.

Zhu WC, Xiao J, Liu Y, Wu J, Li JY. Caries experience in individuals with cleft lip and/or palate in China. *Cleft Palate Craniofac J*. 2010;47(1):43-7.

Tabela 1: *Primers* utilizados para identificação *S. mutans* e de *S. sobrinus* pela técnica de PCR (Oho *et al.*, 2000).

<i>Espécie</i>	<i>Primers: Sequência</i>	<b>Posição</b>
<i>S. mutans</i>	GTFB-F: 5'- ACT ACA CTT TCG GGT GGC TTG G - 3'	(517 pb)
	GTFB-R: 5'- CAG TAT AAG CGC CAG TTT CAT C -3'	
<i>S. sobrinus</i>	GTFI-F: 5'- GAT AAC TAC CTG ACA GCT GAC T - 3'	(712 pb)
	GTFI-R: 5'- AAG CTG CCT TAA GGT AAT CAC T -3'	

Tabela 2: Resultado das análises univariadas para cada uma das variáveis dependentes cuja associação apresentou  $p < 0,25$ .

Desfecho	Variável independente	Variáveis na Equação				
		B	P*	OR**	95% C.I. for EXP(B)***	
					Lower	Upper
Superfícies com cárie ativa	FL/P	0,537	0,303	0,585	0,211	1,624
	Fio dental	-1,323	0,019	3,755	1,239	11,385
	Bochecho fluoretado	-2,356	0,032	0,095	0,011	0,815
	Água Fluoretada	-1,350	0,063	3,857	0,927	16,048
Índice CPOD	FL/P	0,537	0,303	1,710	0,616	4,748
	Instrução materna	-0,829	0,173	2,292	0,696	7,550
	Água	-0,860	0,204	0,423	0,112	1,596
	Aparelho Ortodôntico	1,743	0,004	5,714	1,724	18,944
Cariado (CPOD)	<i>S. sobrinus</i>	-1,495	0,194	0,224	0,024	2,136
	FL/P	0,878	0,111	2,406	0,816	7,095
	Instrução materna	-0,838	0,171	2,311	0,696	7,670
Perdido (CPOD)	Aparelho Ortodôntico	1,030	0,068	2,800	0,928	8,449
	FL/P	1,030	0,242	2,800	0,498	15,734
Restaurado (CPOD)	Aparelho Ortodôntico	1,038	0,205	2,824	0,568	14,044
	FL/P	0,268	0,605	1,308	0,473	3,615
	Instrução materna	-1,058	0,084	2,881	0,868	9,559
	Aparelho Ortodôntico	1,609	0,006	5,000	1,572	15,908
Índice CPOS	<i>S. sobrinus</i>	-1,642	0,154	0,194	0,020	1,846
	FL/P	0,952	0,073	2,591	0,914	7,342
	Escovações diárias	-0,827	0,185	2,286	0,673	7,764

	Aparelho Ortodôntico	1,856	0,003	6,400	1,918	21,352
	Ultima visita ao dentista	-1,111	0,097	0,329	0,089	1,223
	<i>S. sobrinus</i>	-1,569	0,173	0,208	0,022	1,986
	FL/P	0,878	0,111	2,406	0,816	7,095
Cariado (CPOS)	Instrução materna	-0,838	0,171	2,311	0,696	7,670
	Fio dental	-1,118	0,064	0,327	0,100	1,067
	Aparelho Ortodôntico	1,030	0,068	2,800	0,928	8,449
Perdido (CPOS)	FL/P	1,030	0,242	2,800	0,498	15,734
	Aparelho Ortodôntico	1,038	0,205	2,824	0,568	14,044
Restaurado (CPOS)	FL/P	0,537	0,303	1,710	0,616	4,748
	Instrução materna	-0,829	0,173	2,292	0,696	7,550
	<i>S. sobrinus</i>	-1,495	0,194	0,224	0,024	2,136

\*P= nível de significância; \*\*OR= odds ratio; \*\*\* intervalo de confiança em 95%



Tabela 3: Resultado análise multivariada para cada uma das variáveis desfecho.

Desfecho	Variável independente	Teste de Hosmer e Lemeshow	P*	OR**	95% IC para OR***	
					Lower	Upper
Índice CPOD	Aparelho Ortodôntico	0,963	0,005	7,424	1,821	30,273
	FL/P		0,019	5,624	1,325	23,871
Índice CPOS	Aparelho Ortodôntico	0,391	0,001	16,586	3,186	86,342
	Fio dental		0,048	3,338	1,012	11,007
Superfícies com cárie ativa	Bochecho fluoretado	0,539	0,046	10,068	1,037	97,719
	Instrução materna		0,034	4,919	1,125	21,506
Restaurado (CPOD)	Aparelho Ortodôntico	0,632	0,007	7,191	1,723	30,012
	Aparelho Ortodôntico	0,931	0,008	5,923	1,605	21,858

\*P= nível de significância; \*\*OR= odds ratio; \*\*\* intervalo de confiança em 95%

*Considerações finais*

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo foi idealizado em face à prevalência das fissuras lábio-palatinas no Brasil e ao impacto que o tratamento dos indivíduos com FL/P acarreta ao Sistema Único de Saúde, uma vez que sua reabilitação exige centros especializados em média e alta complexidade.

Na literatura consultada, um número reduzido de estudos teve como foco adolescentes e adultos jovens com FL/P e os existentes foram considerados com fraca a moderada evidência científica. Portanto, partiu-se da necessidade de aprofundar o conhecimento sobre os fatores que interferem no desenvolvimento da cárie dentária neste grupo populacional, contribuindo para o planejamento de estratégias para prevenção e diagnóstico precoce da doença, com potencial para reduzir a carga de doença e sofrimento nessa população, comprometida funcional e esteticamente.

Nas condições impostas pelo desenho de estudo adotado, não foi observada diferença significativa entre os grupos caso e controle para higiene bucal, contato com fluoretos, grau de escolaridade materna e presença de *S. mutans* e *S. sobrinus*. Os grupos diferiram significativamente quanto às variáveis: renda *per capita*, presença de cárie ativa, componente cariado do CPOS, índice de placa visível e sangramento gengival. Estes achados confirmam a tendência observada na literatura para uma maior experiência de cárie em indivíduos com FL/P que em seus controles sem FL/P.

Buscando-se controlar a influência de cada uma das variáveis que podem estar relacionadas à experiência de cárie dos indivíduos, os dados foram submetidos à análise multivariada. Concluiu-se que os fatores ambientais, tais como presença de FL/P, utilização de aparatos ortodônticos, escolaridade da mãe, hábitos de higiene e contato com fluoretos foram mais importantes na determinação da experiência de cárie que o fator biológico estudado, isto é a presença de estreptococos do grupo mutans.

Alguns estudos indicam que as variáveis ambientais relacionadas à cárie podem favorecer a diversidade genética dos microrganismos cariogênicos. A adaptação dos microrganismos a um ambiente altamente competitivo por transformação genética pode levar à aquisição de um gene de resistência a um antibiótico ou um fator de virulência, promovendo grande vantagem seletiva. Genótipos mais adaptados a este ambiente competitivo podem elevar o risco à cárie.

A partir do material biológico coletado, um novo passo a seguir no desenvolvimento desta linha de pesquisa será a investigação sobre a influência da diversidade dos microrganismos estudados na determinação da experiência de cárie de indivíduos com FL/P.

## *Referências*

## Referências<sup>1</sup>

ADJIC, D. *et al.* Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proc Natl Acad Sci.**, p. 14434-14439, 1999.

AHLUWALIA, M. *et al.* Dental caries, oral hygiene, and oral clearance in children with craniofacial disorders. **J Dent Res.**, v. 83, p. 175-9, 2004.

AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int Dent J.**, v. 25, p. 229-35, 1975.

ALALUUSUA, S. *et al.* Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. **Arch Oral Biol.**, v. 41, n. 2, p. 167-73, 1996.

AL-DAJANI, M. Comparison of dental caries prevalence in patients with cleft lip and/or palate and their sibling controls. **Cleft Palate Craniofac J.**, v. 46, n. 5, p. 529-31, 2009.

ALVES, L. M. L. H. *et al.* Prevalência de cárie em portadores de fissura lábio-palatais atendidos no Instituto Materno Infantil de Pernambuco. **Odontol. clín-cient.**, v. 3, n. 1, p.57-60, jan.-abr. 2004.

AL-WAHADNI, A.; ALHAIJA, E. A.; AL-OMARI, M. A. Oral disease status of a sample of jordanian people ages 10 to 28 with cleft lip and palate. **Cleft Palate Craniofac J.**,v.. 42, n. 3, p. 304-308, may, 2005.

ANKOLA, A. V. *et al.* Primary dentition status and treatment needs of children with cleft lip and/or palate. **J Indian Soc Pedod Prev Dent.**, v. 23, n. 2, p. 80-2, 2005.

ARCE, B. *et al.* A. Incidence and recurrence risks of labiopalatine clefts. **Rev Paul Med.**, v. 72, n. 5, p. 239-46, 1968.

ARGIMÓN, S.; CAUFIELD, P. W. The distribution of putative virulence genes in *Streptococcus mutans* strains does not correlate with caries experience. **J Clin Microbiol.**, v. 49, n. 3, p. 984-92, jan., 2011.

---

<sup>1</sup> Referências organizadas segundo a ABNT - NBR 6023:2002

ARMADA, L. *et al.* Prevalência de alterações bucais em crianças portadoras de fenda labiopalatinas atendidas no Hospital Municipal Nossa Senhora do Loreto, RJ. **Pesqui. bras. odontopediatria clín. integr.**, v. 5, n. 2, p. 165-70, 2005.

BAELUM, V.; FERJERSKOV, O. Diagnóstico de cárie dentária : um momento de reflexão a caminho da intervenção? In: FERJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária. A doença e seu tratamento clínico.** São Paulo: Editora Santos, 2005:101-10.

BARBOSA, M. M. *et al.* Prevalence of congenital heart diseases in oral cleft patients. **Pediatr Cardiol.**, v. 24, n. 4, p. 369-74, 2003.

BEIGHTON, D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. **Community Dent Oral Epidemiol.**, v. 33, n. 4, p. 248-55, 2005.

BENTLEY, R. W.; LEIGH, J. A.; COLLINS, M. D. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. **Int J Syst Bacteriol.**, v. 41, p.487-94, 1991.

BESSELING, S.; DUBOIS, L. The prevalence of caries in children with a cleft lip and/or palate in Southern Vietnam. **Cleft Palate Craniofac J.**, v. 41, n. 6, p. 629-32, 2004.

BOKHOUT, B *et al.* Prevalence of *Streptococcus mutans* and lactobacilli in 18-month-old children with cleft lip and/or palate. **Cleft Palate Craniofac J.**, v. 33, n. 5, p. 424-8, 1996.

BRASIL. **Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil** – versão 1.0.0, PNUD, IPEA, Fundação João Pinheiro PNUD, 2003. Disponível em <http://www.pnud.org.br/atlas>, acesso em 25/08/2009.

BRITTON, K. F.; WELBURY, R. R. Dental caries prevalence in children with cleft lip/palate aged between 6 months and 6 years in the West of Scotland. **Eur Arch Paediatr Dent.**, v. 11, n. 5, p. 236-41, 2010.

CARDOSO, L. *et al.* Polarização da cárie em município sem água fluoretada. **Cad Saúde Pública**, v. 10, n. 1, p. 237-43, 2003.

CAUFIELD, P. W.; CUTTER, G. R.; DASANAYAKE, A. P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **J Dent Res.**, v. 72, p. 37-45, 1993.

CHENG, L. L.; MOOR, S. L.; HO, C. T. Predisposing factors to dental caries in children with cleft lip and palate: a review and strategies for early prevention. **Cleft Palate Craniofac J.**, v. 44, n. 1, p. 67-72, jan. 2007a.

CHENG, L. L. *et al.* Bacteria and salivary profile of adolescents with and without cleft lip and/or palate undergoing orthodontic treatment. **Aust Dent J.**, v. 52, n. 4, p. 315-21, 2007b.

CUNHA, E. M. *et al.* Antropometria e fatores de risco em recém-nascidos com fendas faciais. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 4, p. 417-22, 2004.

DAHLLÖF, G. *et al.* Caries, gingivitis, and dental abnormalities in preschool children with cleft lip and/or palate. **Cleft Palate Craniofac J.**, v. 26, n. 3, p. 233-8, 1989.

DALBEN, G. S. *et al.* Breast-feeding and sugar intake in babies with cleft lip and palate. **Cleft Palate Craniofac J.**, v. 40, n.1, p. 84-7, 2003.

DAVIS, J. S.; RITCHIE, H. F. Classification of congenial clefts of the lip and palate. **J.A.M.A.**, v. 79, n. 16, p. 1323, 1922.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 191, p. 11-5, 1987.

FEJERSKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. **Caries Res.**, v. 38, p. 182-91, 2004.

FEJERSKOV, O.; BAELUM, V: Changes in prevalence and incidence of the major oral diseases. In: GUGGENHEIM, B.; SHAPIRO, H. (eds). **Oral biology at the turn of the century: Truth, Misconcepts and Challenges**. Basel, Karger, 1998, p 1–11.

FEJERSKOV, O.; NYVAD, B: Is dental caries an infectious disease? Diagnostic and treatment consequences for the practitioner. In: SCHOU, L. (ed). **Nordic Dentistry 2003 Yearbook**. Copenhagen, Quintessence Publishing, 2003, p. 141–51.

FOGH-ANDERSEN, P. **Inheritance of harelip and cleft palate: contribution to the elucidation of the etiology of the congenital clefts of the face 1942**. [Dissertation]. Copenhagen: Busck; 1942.

FREITAS, J. A. S. *et al.* Current data on the characterization of oral clefts in Brazil. **Braz Oral Res.**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 128-33, jun., 2004.

FREITAS, J. A. S. Uma parceria que deu certo. **Relatório de Atividades Técnico-Científicas e Financeiro**. Hospital de Pesquisa e Reabilitação Lábio-Palatais. Universidade de São Paulo. Bauru. 1998.



GOLD, O. C.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *S. mutans*. **Arch Oral Biol.**, v. 18, p. 1356-64, 1973.

GRÖNROOS, L. **Quantitative and qualitative characterization of mutans streptococci in saliva and in dentition**. Academic Dissertation, august, University of Helsinki, Finland, 2000, 80p.

GUIMARÃES, R. C. C. **Inquérito Epidemiológico da fissura lábio-palatal no município de Belo Horizonte**. 2004.101p. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Saúde Coletiva Faculdade de Odontologia - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

HAGBERG, C.; LARSON, O.; MILERAD, J. Incidence of cleft lip and palate and risks of additional malformations. **Cleft Palate Craniofac J.**, v. 35, n. 1, p. 40-5, jan., 1998.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev.**, v. 44, n. 2, p. 331-84, 1980.

HARDIE, J. M. Oral Streptococci. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.2, 1986. p.1054-1063.

HARRINGTON, D. J.; RUSSELL, R. R. Identification and characterization of two extracellular proteases of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 121, p. 237-41, 1994.

HASSLÖF, P.; TWETMAN, S. Caries prevalence in children with cleft lip and palate — a systematic review of case–control studies. **Int J Paediatr Dent.**, v. 17, n. 5, p. 313-9, 2007.

HAZZA'A, A. *et al.* Dental and oral hygiene status in Jordanian children with cleft lip and palate: a comparison between unilateral and bilateral clefts. **Int J Dent Hyg.**, v. 9, n. 1, p. 30-6, 2011.

HEWSON, A. R. *et al.* Dental experience of cleft affected children in the west of Ireland. **Int Dent J.**, v. 51, p. 73-6, 2001.

HOMER, K. A.; WHILEY, R. A.; BEIGHTON, D. Proteolytic activity of oral streptococci. **FEMS Microbiology Letters**, v. 55, p. 257-60, 1990.

ISMAIL, A. I. *et al.* (coord) ICDAS committee (2005). **Rationale and evidence for the international caries detection and assessment system (ICDAS II)** In: STOOKEY, G. (ed) Proceedings of the 7th Indiana Conference, Indianapolis, Indiana, p 161-222.

JACKSON, R. J.; LIM, D. V.; DAO, M. L. Identification and analysis of a collagenolytic activity in *Streptococcus mutans*. **Current Microbiology**, v. 34, p. 49-54, 1997.

JOHNSEN, D. C.; DIXON, M. Dental caries of primary incisors in children with cleft lip and palate. **Cleft Palate J.**, v. 21, p. 104-9, 1984.

KANASI, E. *et al.* Clonal analysis of the microbiota of severe early childhood caries. **Caries Res.**, v.44, n. 5, p. 485-97, 2010.

KIRCHBERG, A.; TREIDE, A.; HEMPRICH, A. Investigation of caries prevalence in children with cleft lip, alveolus, and palate. **J Craniomaxillofac Surg.**, v. 32, n. 4, p. 216-9, aug., 2004.

KOCH, G. *et al.* Epidemiologic study of idiopathic enamel hypomineralization in permanent teeth of Swedish children. **Community Dent Oral Epidemiol.**, v. 15, p. 279-85, 1987.

KÖHLER, B.; ANDRÉEN, 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.14-7, march, 1988.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico, texto e atlas colorido.** 5.ed. Rio de Janeiro : Medsi, 2001. 1465p.

LAGES, E. M. B.; MARCOS, B.; PORDEUS, I. A. Oral health of individuals with cleft lip, cleft palate, or both. **Cleft Palate Craniofac J.**, v. 41, n. 1, p. 59-63, jan., 2004.

LAGES, E. M. B.; MARCOS, B.; PORDEUS, I. A. Saúde bucal em portadores de fissura lábio-palatal: revisão. **Rev CRO-MG**, v. 6, n. 2, p. 88-93, 2000.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159-74, 1977.

LAUTERSTERN, A. M.; MENDELSON, M. An analysis of the caries experience of 285 cleft palate children. **Cleft Palate J.**, v.1, p.314-19, 1964.

LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral.** 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005. 1013p.

LOESCHE, W. J. Role of Streptococcus mutans in humans dental decay. **Microbiol. Review**, v. 50, p. 353-80, 1986.

LOFFREDO, L. C. M. *et al.* Oral clefts and vitamin supplementation. **Cleft Palate Craniofac J.**, v. 38, n. 1, p. 76-83, 2001.

LOFFREDO, L. C. M.; FREITAS, J. A. S.; GRIGOLLI, A. A. G. Prevalência de fissuras orais de 1975 a 1994 no Brasil. **Rev. de Saúde Pública**, v. 35, n. 6, p. 571-5, 2001.

LUCAS, V. *et al.* Dental health indices and caries associated microflora in children with unilateral cleft lip and palate. **Cleft Palate Craniofac J.**, v.37, p. 447-52, 2000.

MARSH, P. D. Oral ecology and its impact on oral microbial diversity. In: KURAMITSU, H. K.; ELLEN, R. P. **Oral bacterial ecology: the molecular basis**. Norfolk: Horizon Scientific Press; 2000.

MARTELLI JÚNIOR, H. *et al.* Estudo epidemiológico das fissuras labiais e palatais em Alfenas, Minas Gerais, de 1986 a 1998. **RPG Rev Pós Grad.**, v. 13, p. 31-5, 2006.

MARTELLI-JUNIOR, H. *et al.* Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in the state of Minas Gerais, Brazil, between 2000-2005. **Braz Oral Res.**, v. 21, n. 4, p. 314-7, 2007.

MATTOS-GRANER, R. O. *et al.* Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12 to 30-months-old children. **J Dent Res.**, v. 79, p. 1371-7, 2000.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Saúde. **Metodologia de alocação eqüitativa de recursos: uma proposta para Minas Gerais**. / Mônica Viegas Andrade et al. Belo Horizonte: 2004. Disponível em: [http://www.cedeplar.ufmg.br/seminarios/seminario\\_diamantina/2006/D06A045.pdf](http://www.cedeplar.ufmg.br/seminarios/seminario_diamantina/2006/D06A045.pdf), acesso em 25 de agosto de 2009.

MITCHELL, L. E. *et al.* Guidelines for the design and analysis of studies on nonsyndromic cleft lip and cleft palate in humans: summary report from a workshop of the international consortium for oral clefts genetics. **Cleft Palate Craniofac J.**, v. 39, n. 1, p. 93-100, jan., 2002,

MONLLEO, I. L.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V. L. Anomalias craniofaciais: descrição e avaliação das características gerais da atenção no Sistema Único de Saúde. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n. 5, May 2006 .

MOREIRA, M. **Variabilidade genética de *Streptococcus mutans* em isolados intrafamiliares, por meio de marcadores RAPD**. 2006. 108p. Dissertação (mestrado), Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MOSSEY, P. A.; LITTLE, J. Epidemiology of oral clefts: an international perspective. In: Wyszynski DF, editor. **Cleft lip and palate from origin to treatment**. New York: Oxford University Press; 2002. p. 127-58.

MUHLEMAN, H.; SON, S. Gingival sulcus index. A leading symptom in initial gingivitis. **Helv Odontol Acta**, v. 42, p. 195-209, 1971.

MUTARAI, T.; RITTHAGOL, W.; HUNSRISAKHUN, J. Factors influencing early childhood caries of cleft lip and/or palate children aged 18 to 36 months in southern Thailand. **Cleft Palate Craniofac J.**, v. 45, n. 5, p. 468-72, sep., 2008.

NAGEM FILHO, H; MORAIS, N.; ROCHA, R. G. F. Contribuição para o estudo da prevalência das malformações congênitas labiopalatais na população escolar de Bauru. **Rev Fac Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 111-128, abr.-jun. 1968.

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

NUNES, L. M. N.; QUELUZ, D. P.; PEREIRA, A. C. Prevalência de fissuras labiopalatais no município de Campos dos Goytacazes-RJ, 1999-2004. **Rev. bras. epidemiol.**, São Paulo, v. 10, n. 1, mar. 2007.

NURELHUDA, N. M. *et al.* Caries experience and quantification of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva of Sudanese schoolchildren. **Caries Res.**, v. 44, n. 4, p. 402-7, 2010.

OHO, T. *et al.* Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polimerase chain reaction. **Oral Microbiol Immunol.**, v. 15, n. 4, p. 258-62, 2000.

OPCS - Office of Population Censuses and Surveys. **The OPCS Monitoring Scheme for Congenital Malformations. Office of Population Censuses and Surveys.** Congenital malformation statistics. Notifications 1992. London: HMSO;1995.

PALMER, C.A. *et al.* Diet and caries-associated bacteria in severe early childhood caries. **J Dent Res.**, v, 89, n. 11, p. 1224-9, nov., 2010.

PARAPANISIOU, V. *et al.* Oral health status and behaviour of Greek patients with cleft lip and palate. **Eur Arch Paediatr Dent.**, v. 10, n. 2, p. 85-9, 2009.

PAUL, T.; BRANDT, R. S. Oral and dental health status of children with cleft lip and/or palate. **Cleft Palate Craniofac J.**, v. 35, p. 329-32, 1998.

PERES, M. A. *et al.* Effects of social and biological factors on dental caries in 6-year-old children: a cross sectional study nested in a birth cohort in Southern Brazil. **Rev Bras Epidemiol.**, v. 6, n. 4, p. 293-306, 2003.

PIERALISI, F. J. *et al.* Genotypic diversity of streptococcus mutans in caries-free and caries-active preschool children. **Int J Dent.**, 2010; 2010 Nov 23 [Epub ahead of print]: 824976.  
doi: 10.1155/2010/824976. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2836815/pdf/IJD2010-824976.pdf>.

PITTS, N.B.; EVANS, D.J. **British Association for the Study of Community Dentistry (BASCD) co-ordinated National Health Service surveys of caries prevalence 1985/6-1995/6.** Community Dental Health, v. 14, n. Suppl 1, p. 1-5, 1997.

PSOTER, W. J. *et al.* PCR detection of Streptococcus mutans and Aggregatibacter actinomycetemcomitans in dental plaque samples from Haitian adolescents. **Clin Oral Investig.**, v. 15, n. 4, p. 461-9, maio, 2010.

QIU, W. **Oral and maxillofacial surgery in china: past, present and future.** chinese society of oral and maxillofacial surgery, jan. 2004. Disponível em <http://www.omschina.org.cn/en/society/introduction/2004/0111/2965.html>

RITTHAKOL, W. The incidence of cleft lip and palate in Songklanakar hospital between 1990–1999. **J Dent Assoc Thai.**, v. 51, p. 29-37, 2001.

RUIZ, M. A.S. *et al.* Anomalías dentarias en la dentadura decidua en pacientes portadores de fisura completa unilateral de labio y paladar. **Rev Fac Odont Univ Chile**, v. 17, p. 35-41, 1999.

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

SAIKI, R. K. *et al.* Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-91, 1988.

SEOW, W. K. Biological mechanisms of early childhood caries. **Community Dent Oral Epidemiol.**, v. 26, n.1 suppl., p. 28-31, 1998.

SMITH, D. J.; TAUBMAN, M. A. Vaccines against dental caries infection. In: LEVINE, M. M. *et al.* **New generation of vaccines**. New York: Marcel Dekker, 1997; p.913-930.

SMITH, G.; SPATAFORA, G. A. Gene Regulation in *S. mutans*: Complex Control in a Complex Environment. **J DENT RES.**, July 8, 2011 0022034511415415, first published on July 8, 2011 doi:10.1177/0022034511415415.

SOET, J. J. *et al.* Transmission of mutans streptococci between mothers and children with cleft lip and/or palate. **Cleft Palate Craniofac J.**, v. 35, n. 5, p. 460-4, 1998.

SPINA, V. A proposed modification for the classification of cleft lip and palate. **Cleft Palate J.**, v. 10, p. 251-2, 1973.

SPINA, V.; PSILLAKIS, J. M.; LAPA F. S. Classificação das fissuras labiopalatinas: sugestão de modificação. **Rev Hosp Clín Fac Med São Paulo**, v. 27, n. 1, p. 5-6, 1972.

STEC-SLONICZ, M.; SZCZEPAŃSKA, J.; HIRSCHFELDER, U. Comparison of caries prevalence in two populations of cleft patients. **Cleft Palate Craniofac J.**, v. 44, n. 5, p. 532-7, sept., 2007.

TOLAROVÁ, M. M.; CERVENKA, J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. **Am J Med Genet.**, v. 75, n. 2, p. 126-37, 1998.

VALLINO-NAPOLI, L. D.; RILEY, M. M.; HALLIDAY, J. An epidemiologic study of isolated cleft lip, palate, or both in Victoria, Australia from 1983 to 2000. **Cleft Palate Craniofac J.**, v. 41, n. 2, p. 185-94, march, 2004.

VEAU, V. Classification of cleft lip and palate. In: Cleft lip and palate: surgical dental and speech aspects. In: GRABB, W.C. *et al.* **Cleft lip and palate: surgical dental and speech aspects**. Boston, Little & Brown, 1971. 80 p.

VICTORA, C. G.; BARROS, F. C. Infant mortality due to perinatal causes in Brazil: trends, regional patterns and possible interventions. **Sao Paulo Med J.**, v. 119, n. 1, p. 33-42, 2001.

VILELA, A. C. S.; SACRAMENTO, E. P.; GOMIDE, M. R. Educação dos pais versus saúde bucal de bebês fissurados. **Rev Assoc Paul Cirurg Dent.**, v. 50, p. 357-60, 1996.

WHILEY, R. A.; BEIGHTON, D. Current classification of the oral streptococci. **Oral Microbiol Immunol.**, v. 13, n. 4, p. 195-216, 1998.

WHITTENBURY, R. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. **J Gen Microbiol.**, v. 35, n. 1, p. 13-26, 1964.

WONG, F. W.; KING, N. M. The oral health of children with clefts—a review. **Cleft Palate Craniofac J.**, v. 35, p. 248-54, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global strategies to reduce the health-care burden of craniofacial anomalies.** Geneva: World Health Organization, 2002.

ZHU, W. C.; XIAO, J.; LIU, Y.; WU, J.; LI, J. Y. Caries experience in individuals with cleft lip and/or palate in China. **Cleft Palate Craniofac J.**, v. 47, n. 1, p. 43-7, 2010.

*Anexos*






# **UNIFENAS**

## **COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

### **PARECER Nº 167/2008**

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP, da UNIFENAS, constituído de conformidade com a Portaria nº 32, de 19 de abril de 2001, da Reitoria, e nos termos da Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, tendo analisado, nesta data, o protocolo do projeto de pesquisa intitulado **EXPERIÊNCIA DE CÁRIE E DIVERSIDADE GENÉTICA DE MICRORGANISMO CARIOGÊNICOS EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE FISSURAS LÁBIO-PALATAIS: ESTUDO CASO-CONTROLE.**; de autoria da Profa. Amanda Beatriz D. A. de Freitas, resolveu enquadrá-lo na categoria de aprovado.

Alfenas, 24 de outubro de 2008.

  
Profª Helena Engel Velano  
Coordenadora do CEP



Data para apresentação do relatório final: 01/04/09 01/10/2009

Modelo do Relatório Final e Parcial: <http://www.unifenas.br/pesquisa/>



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 3297/09

**Interessado(a):** Profa. Cláudia Silami de Magalhães  
Departamento de Odontologia Restauradora  
Faculdade de Odontologia - UFMG

#### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 16 de setembro de 2009, o projeto de pesquisa intitulado "Experiência de cárie e diversidade genética de microorganismos cariogênicos em indivíduos com fissuras lábio-palatais: estudo caso-controle" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Prof. Maria Teresa Marques Amaral**  
Coordenadora do COEP-UFMG