



Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Odontologia de Piracicaba



UNICAMP

Associação entre a cárie precoce da infância, composição microbológica do biofilme dentário e dieta em pré-escolares entre 3 e 4 anos de idade

Aluna: Fernanda Dinarowski

Orientadora: Prof^a Dr^a Marinês Nobre dos Santos Uchôa

Colaboradora: Doutoranda Thaís Manzano Parisotto

Piracicaba
Outubro de 2010

Autora: Fernanda Dinarowski

Associação entre a cárie precoce da infância, composição microbiológica do biofilme dentário e dieta em pré-escolares entre 3 e 4 anos de idade

Orientadora: Prof^a Dr^a Marinês Nobre dos Santos Uchôa

Piracicaba
Outubro de 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª. / 8099

D61a	<p>Dinarowski, Fernanda. Associação entre a cárie precoce da infância, composição microbiológica do biofilme dentário e dieta em pré-escolares entre 3 e 4 anos de idade / Fernanda Dinarowski. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010. 22f. : il.</p> <p>Orientador: Marinês Nobre dos Santos Uchoa. Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Odontopediatria. 2. Cárie dentária em crianças. 3. Microrganismos. I. Nobre dos Santos, Marinês. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p>(eras/fop)</p>
------	---

Resumo:

Objetivou-se nesse estudo verificar a influência da composição microbiológica do biofilme dentário e dieta no incremento de cárie de pré-escolares de 3-4 anos, após 1 ano de acompanhamento. Após a realização dos exames clínicos, 60 pré-escolares foram divididos em 3 grupos: incremento de cárie=0 (I0), incremento de cárie ≥ 3 (I3) e redução de cárie (RC). O biofilme dentário foi coletado e analisado quanto aos níveis de estreptococos do grupo mutans (SM), lactobacilos (LB) e microrganismos totais (MT). Para determinar a frequência de consumo de açúcar, pais e professores preencheram um diário de dieta por 3 dias consecutivos. Os dados foram submetidos ao teste Wilcoxon e qui-quadrado. As médias (\pm desvios-padrão) da contagem de SM, MT e LB no baseline/longitudinal para os grupos I0, I3 e RC foram respectivamente: 6,65 ($\pm 0,72$), 8,60 ($\pm 1,08$), 0,07 ($\pm 0,30$) / 6,73 ($\pm 0,75$), 8,03 ($\pm 1,50$), 0,21 ($\pm 0,63$); 6,98 ($\pm 0,86$), 9,1 ($\pm 0,64$), 0,86 ($\pm 1,26$) / 7,02 ($\pm 0,48$), 8,45 ($\pm 1,32$), 1,68 ($\pm 1,35$); 6,85 ($\pm 1,12$), 8,77 ($\pm 0,95$), 0 (± 0) / 6,85 ($\pm 0,80$), 8,0 ($\pm 1,10$), 0 (± 0). Diferença estatística significativa foi verificada apenas com relação aos níveis de LB no baseline e longitudinal no grupo I3 ($p < 0,05$). Além disso, o teste X^2 evidenciou uma associação significativa entre a presença de LB e o fato da criança ser colocada para dormir com mamadeira contendo líquido açucarado no *baseline* e o desenvolvimento de lesões de cárie. Conclui-se que os níveis de lactobacilos no biofilme dentário e o uso da mamadeira para dormir apresentam-se fortemente associados ao desenvolvimento de novas lesões de cárie.

Palavras - Chave:

Cárie precoce de infância, *Streptococcus mutans*, lactobacilos, microrganismos totais, biofilme dentário.

Abstract:

The objective of this study was to assess the influence of the microbiological composition of dental plaque and caries increment in children aged 3-4, after one year of follow up the diet of preschool. After the clinical examination, 60 preschoolers were divided into three groups: caries increment = 0 (I0), caries increment ≥ 3 (I3) and reduction of dental caries (RC). The biofilm was collected and analyzed for levels of streptococci mutans (SM), lactobacilli (LB) and total microorganisms (TM).

To determine the children's daily frequency of meals containing sugar, the mothers and the health agents of the school nurseries participating in the study were asked to fill a diet chart for 3 consecutive days. The data were subjected to Wilcoxon and chi-square. The mean (\pm SD) score of SM, MT at baseline and LB / groups for longitudinal I0, I3 and RC were respectively 6.65 (± 0.72), 8.60 (± 1.08), 0.07 (± 0.30) / 6.73 (± 0.75), 8.03 (± 1.50), 0.21 (± 0.63), 6.98 (± 0.86), 9.1 (± 0.64), 0.86 (± 1.26) / 7.02 (± 0.48), 8.45 (± 1.32), 1.68 (± 1.35) 6.85 (± 1.12), 8.77 (± 0.95), 0 (± 0) /

6.85 (\pm 0.80), 8.0 (\pm 1.10), 0 (\pm 0). Statistically significant difference was observed only with respect to baseline levels in LB and in the longitudinal group I3 ($p < 0.05$). Additionally, the X² test showed a significant association between the presence of LB and the fact that the child be put to sleep with a bottle containing sugary liquid in the baseline and the development of caries. It is concluded that the levels of lactobacilli in dental plaque and bottle-feeding to sleep feature strongly associated with the development of new carious lesions.

Sumário:

Resumo	4
Introdução	7
Objetivo	9
Materiais e métodos	10
Análise estatística	13
Resultados	14
Discussão	19
Conclusão	21
Referências	22

Introdução:

A cárie precoce da infância é definida como a presença de uma ou mais superfícies dentárias cariadas (cavidadas ou não), perdidas ou obturadas em pré-escolares com idade inferior a 06 anos. A presença de padrões atípicos, progressivos, agudos ou rampantes desta doença é designada cárie precoce da infância severa (DRURY et al., 1999).

Clinicamente, as lesões iniciais apresentam-se como manchas brancas opacas no terço cervical da superfície vestibular e lingual dos incisivos decíduos superiores (RAMOS-GOMEZ, 2002). Em seqüência, as lesões aumentam em extensão, tornam-se cavidadas e os outros dentes são acometidos, o que pode culminar na destruição de toda a dentadura decídua. A perda precoce de dentes decíduos pode acarretar em uma série de transtornos no desenvolvimento adequado do sistema estomatognático. Em conseqüência, a função mastigatória, a fonação e a deglutição ficam comprometidas e a instalação de hábitos para funcionais é favorecida, além de ocorrer a perda do guia de erupção dos dentes permanentes (MOYERS, 1988). Ainda, verificam-se piores condições na qualidade de vida (FEITOSA et al., 2005), peso e altura reduzidos (AYHAN et al., 1996) e um maior número de faltas escolares (GIFT et al., 1992).

Comparando-se o Brasil com outros países do mundo, verifica-se que a prevalência da CPI é alta e varia de 23,4% a 40,5% de acordo com RIHS et al., 2007, FERREIRA et al., 2007 e OLIVEIRA et al., 2008. Mais importante, a população infantil que apresenta CPI possui maior risco ao desenvolvimento de cárie no futuro, sendo a experiência passada dessa doença considerada um dos preditores de risco mais significativos (PERETZ et al., 2003).

Os fatores primários relacionados com a etiologia do processo cariioso e da CPI são a presença de bactérias cariogênicas, carboidratos fermentáveis (especialmente líquidos açucarados), e hospedeiro/superfície dentária susceptível, que interagem em determinado período de tempo (HARRIS et al., 2004, SELWITZ et al., 2007). Dentre esses fatores, a freqüência de exposição à sacarose tem sido destacada como responsável pelas alterações microbiológicas (LOESCHE 1986, NOBRE DOS SANTOS et al., 2002) no

biofilme dentário, visto que serve de substrato específico para a produção de polissacarídeos extracelulares insolúveis (LOESCHE, 1986). Esses aumentam a viscosidade do biofilme e facilitam a aderência microbiana em grande quantidade, o que favorece a ocorrência do processo cariioso.

A microbiota cariogênica é representada por bactérias capazes de colonizar a superfície dentária e produzir ácido, em velocidade superior à capacidade de neutralização do biofilme, quando o pH encontra-se abaixo do crítico; deste modo, ocorre a dissolução do esmalte. Os estreptococos do grupo mutans apresentam tais características e inúmeros estudos mostram que os mesmos estão intimamente relacionados com o desenvolvimento da cárie na infância (MATTOS-GRANER et. al, 1998, MILGROM et al., 2000, NOBRE DOS SANTOS et. al, 2002, VACHIRAROJPISAN et al., 2004). Além disso,, durante a variação cíclica do pH na cavidade bucal devido a fermentação dos carboidratos pelos estreptococos grupos mutans, os substratos ácidos danificam as superfícies dentárias o que permite a colonização dos lactobacilos, bactérias acidogênicas que também favorecem o processo cariioso (RAMOS-GOMÉZ et al., 2002).

Objetivo

O presente projeto de pesquisa teve como objetivo verificar a influência da composição microbológica do biofilme dentário e da dieta no incremento de cárie de pré-escolares de 3-4 anos, após 1 ano de acompanhamento

Materiais e Métodos:

Considerações éticas

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP-UNICAMP sob o protocolo 017/08. Os pais ou responsáveis que concordarem com a inclusão de seu(a) filho(a) na pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 196/96).

Amostra

Inicialmente recrutou-se 169 crianças de 3 a 4 anos, de ambos os gêneros, que freqüentam regularmente creches e pré-escolas municipais da cidade de Itatiba SP/Brasil serão incluídas no estudo. Todas as creches públicas e pré-escolas do município em um total de 23 localizadas na zona urbana foram incluídas. Itatiba possui uma população de aproximadamente 90 mil habitantes e apresenta programa de fluoretação de águas de abastecimento público (0,7 ppm F) desde 1980.

Após o exame clínico para diagnóstico de cárie as crianças foram divididas em três grupos: 1. grupo de crianças livres de cárie-LC (n=53), nesse grupo as crianças não apresentavam cavidades e lesões de manchas brancas ativas; 2. grupo das crianças que apresentavam apenas lesões de manchas brancas ativas -LMB (n=56) e 3. grupo de crianças com no mínimo uma cavidade de cárie - LCC (n=60). Porém, devido ao fato da literatura científica evidenciar um número escasso de trabalhos que realizaram acompanhamento longitudinal em comparação com o número de estudos transversais, decidiu-se selecionar um número menor de crianças (n=60) para acompanhar longitudinalmente.

Exame clínico e coleta do biofilme dentário

O diagnóstico de cárie dentária foi realizado pelo método de inspeção visual, com o auxílio de espelho clínico, sonda CPITN, lanterna portátil, limpeza e secagem dos dentes com gaze, de acordo com o critério da Organização Mundial de Saúde incluindo lesões iniciais de mancha branca (ASSAF et al., 2006).

Os exames foram realizados por um único cirurgião-dentista previamente calibrado. Tanto no *baseline* como no longitudinal, foi realizada uma aferição do diagnóstico de cárie, para avaliação da concordância intra-examinador. Para isso, cerca de 10% das crianças foram reexaminadas, com um intervalo de tempo de no mínimo uma semana entre os exames. Posteriormente à realização do diagnóstico da cárie, em um outro dia, o biofilme foi coletado de todas as superfícies lisas livres (exceto do interior das cavidades) com auxílio de alças plásticas descartáveis esterilizadas com abertura circular em seu extremo de 1 μ L, a fim de se padronizar a quantidade de biofilme removido. Em seguida, as amostras foram inoculadas em microtubos de centrifuga pré-pesados e esterilizados, com capacidade de 1,5 mL, que contém RTF (Reduced Transport Fluid, - SYED AND LOESCHE, 1972). Estes microtubos de centrifuga foram colocados em recipiente refrigerado (4°C) e transportados para a FOP-UNICAMP, onde análise microbiológica foi realizada. Essa análise foi realizada em um período de até 8 horas após a coleta para manter a viabilidade celular (conforme estudo realizado anteriormente – processo FAPESP 2007/01197-1). Esses procedimentos foram realizados no *baseline* e após 1 ano de acompanhamento.

Análise microbiológica do biofilme dentário

Durante a análise laboratorial, as amostras de biofilme dentário coletadas foram submetidas a 1 minuto de vibração em agitador de tubos, a fim de obter de uma suspensão uniforme para a diluição em série decimal de 10⁻¹ a 10⁻⁶ em solução salina estéril 0,9%. Alíquotas de 25 μ L de cada diluição foram inoculadas, em triplicata, em placas de Petri contendo meio Mitis-Salivarius com bacitracina - MSB, Ágar Sangue (AS) e Rogosa. As placas de MSB e AS foram colocadas em jarras de anaerobiose, às quais foram incubadas à 37°C em estufa por 24 horas enquanto as placas de Rogosa foram incubadas por 48 horas. As colônias crescidas em MSB, AS e Rogosa foram

contadas com o auxílio de uma lupa estereoscópica para determinação do número de UFC/mL.

Análise da dieta

Para determinar a frequência de consumo de açúcar, pais e professores preencheram um diário de dieta por 3 dias consecutivos (NOBRE DOS SANTOS et al., 2002). Assim, foram avaliados não apenas os alimentos consumidos em casa, mas também aqueles consumidos na creche ou pré-escola, o que aumentou a fidelidade os dados coletados. Foi especificado no diário o horário de ingestão bem como o conteúdo de todas as refeições principais e secundárias. Com base nesses dados, foi estimada a média diária da frequência de exposição aos açúcares provenientes de alimentos nas formas líquida e sólida.

Análise estatística:

A associação do desenvolvimento de lesões cárie e às variáveis dieta e composição microbiológica do biofilme dentário no *baseline* foi avaliada utilizando-se o teste de qui-quadrado. Além disso, o teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar nos níveis de microrganismos no *baseline* e longitudinal. Essas análises, foram realizadas considerando um nível de significância de 5% e intervalo de confiança de 95%.

Resultados:

A análise das Tabelas de 1 a 3 evidencia que houve diferença estatística significativa apenas com relação aos níveis de LB quando comparados o baseline e longitudinal no grupo I3 ($p < 0,05$).

A tabela 4 abaixo evidencia a associação entre dieta e composição microbiológica do biofilme no *baseline* e o desenvolvimento de lesões de cárie após um ano de acompanhamento. Na tabela 4 observa-se significância estatística para a presença de LB e o fato da criança ser colocada para dormir com a mamadeira contendo líquido açucarado ($p < 0,05$)

Tabela 1: Médias e desvios- padrão dos níveis de estreptococos do grupo mutans no biofilme dentário de acordo com os grupos amostrais:

Grupo	Estreptococos mutans	
	Baseline	Longitudinal
I0	6,65 ± 0,72 ^a	6,73 ± 0,75 ^a
I3	6,98 ± 0,86 ^a	7,02 ± 0,48 ^a
RC	6,85 ± 1,12 ^a	6,85 ± 0,80 ^a

Valores expressos em logaritmo de base 10. I0: incremento de cárie=0; I3 incremento de cárie ≥ 3 ; RC redução de cárie. Letras iguais na mesma linha representam ausência de significância estatística ($\alpha = 0,05$).

Tabela 2: Médias e desvios- padrão dos níveis de Lactobacilos no biofilme dentário de acordo com os grupos amostrais:

Grupo	Lactobacilos	
	Baseline	Longitudinal
I0	0,07 ± 0,30 ^a	0,21 ± 0,63 ^a
I3	0,86 ± 1,26 ^a	1,68 ± 1,35 ^b
RC	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a

Valores expressos em logaritmo de base 10. I0: incremento de cárie=0; I3 incremento de cárie ≥ 3 ; RC redução de cárie. Letras iguais na mesma linha representam ausência de significância estatística ($\alpha = 0,05$).

Tabela 3: Médias e desvios- padrão dos níveis de Microrganismos Totais no biofilme dentário de acordo com os grupos amostrais:

Grupo	Microrganismos totais	
	Baseline	Longitudinal
I0	8,60 \pm 1,08 a	8,03 \pm 1,50 a
I3	9,10 \pm 0,64 a	8,45 \pm 1,32 a
RC	8,77 \pm 0,95 a	8,00 \pm 1,10 a

Valores expressos em logaritmo de base 10. I0: incremento de cárie=0; I3 incremento de cárie ≥ 3 ; RC redução de cárie. Letras iguais na mesma linha representam ausência de significância estatística ($\alpha = 0,05$).

Uma melhor visualização dos níveis de microrganismos totais (MT), estreptococos do grupo mutans (SM) e lactobacilos (LB) no biofilme dentário de acordo com os grupos experimentais no *baseline* e longitudinal, ou seja, após um ano de acompanhamento encontra-se nos gráficos abaixo.

Gráfico 1: Médias e desvios- padrão dos níveis de Microrganismos totais (MT), Streptococos mutans (SM) e lactobacilos (LB) no biofilme dentário no grupo incremento de cárie igual a zero:

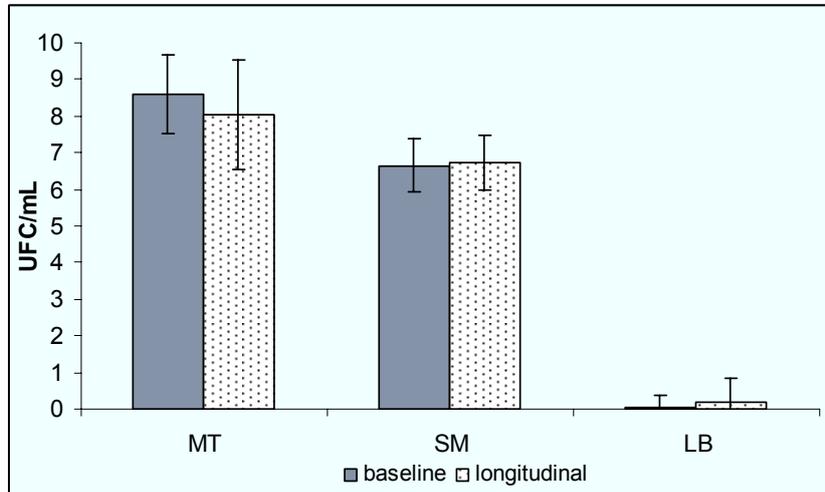


Gráfico 2: Médias e desvios- padrão dos níveis de Microrganismos totais (MT), Streptococos mutans (SM) e lactobacilos (LB) no biofilme dentário no grupo incremento de cárie igual ou superior a três:

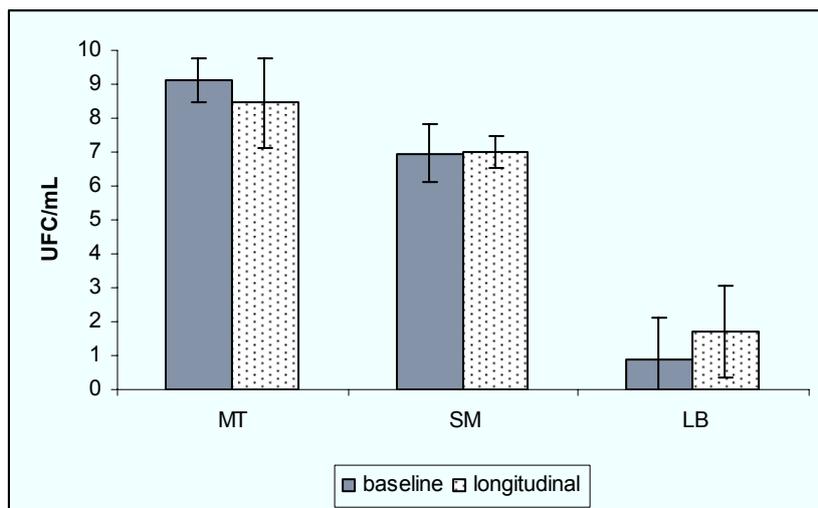


Gráfico 3: Médias e desvios- padrão dos níveis de Microrganismos totais (MT), Streptococos mutans (SM) e lactobacilos (LB) no biofilme dentário no grupo redução de cárie:

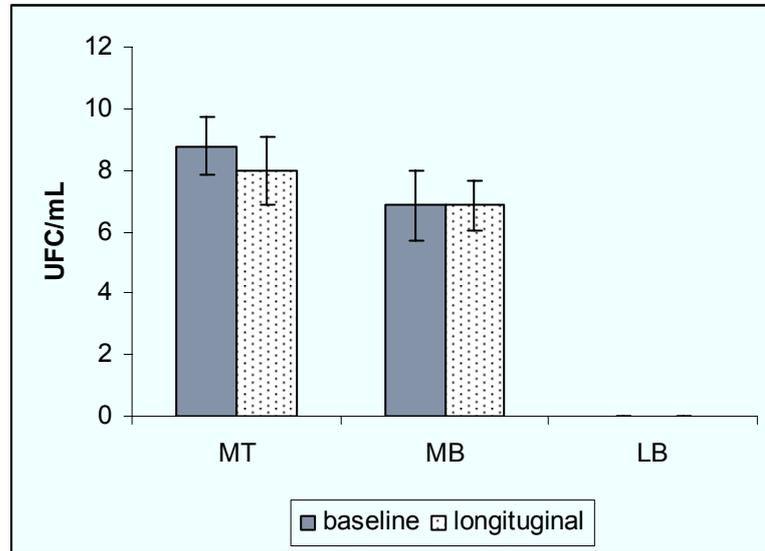


Tabela 4. Associação entre os fatores microbiológicos e dietéticos no *baseline* e o desenvolvimento de lesões de cárie após um ano de acompanhamento.

Variáveis	Incremento ≥ 3	
	sim	não n ⁺ (%) [§]
Contagem de microrganismos totais (UFC/mL)	p = 0,428	
≥ 6.57	16(62)	10(38)
< 6.57	18(72)	7(28)
Contagem de estreptococos do grupo mutans (UFC/mL)	p = 0,234	
≥ 9.15	16(59)	11(41)
< 9.15	18(75)	6(25)
Lactobacilos	p = 0,012 *	
Presentes	2(25)	6(75)
Ausentes	32(74)	11(26)
Frequência diária de açúcar total	p = 0,843	
> 5	17(68)	8(32)
≤ 5	17(65)	9(35)
Uso de mamadeira	p = 0,320	
Sim	17(61)	11(39)
Não	17(74)	6(26)
Colocar a criança para dormir com a mamadeira contendo líquido açucarado	p = 0,048 *	
Sim	14(54)	20(46)
Não	20(80)	5(20)

Discussão

O presente estudo comprovou que existe associação significativa entre o desenvolvimento de lesões de cárie em pré-escolares e a presença de lactobacilos bem como o uso de mamadeira para dormir.

De acordo com a tabela 1, a quantidade de SM se manteve praticamente constante para todos os grupos, quando compara-se o *baseline* com o longitudinal. Nesse sentido, o estudo de Mattos-Graner sugeriu que os níveis de estreptococos mutans atingem uma estabilidade após os 2 anos de idade, o que concorda com os nossos achados (tabela 1). Além disso, o fato da quantidade de SM ter - se mantido similar para todos os grupos enfatiza que a cárie não está relacionada apenas com a quantidade de SM.

Considerando-se o aspecto multifatorial da cárie, Vadiakas 2008 em sua revisão ressalta que a doença pode se manifestar de diferentes maneiras em diferentes etnias, grupo socioeconômico, dieta, e experiência passada de cárie. Isso está de acordo com os resultados encontrados.

Os lactobacilos são microrganismos fortemente relacionados à progressão das lesões de cárie(Fejerskov e Kidd) devido à formação de novos nichos ecológicos (tanto cavidades como lesões de manchas brancas rugosas) que favorecem a aderência desses microrganismos em grande quantidade. Dessa forma, a tabela 2 apresenta resultado de acordo com literatura, pois observou-se um aumento significativo($p=0,049$). na quantidade de LB no grupo I3(Incremento de cárie ≥ 3). Ainda, a Tabela 4 revela que a presença de LB no *baseline* encontra-se significativamente associada ao desenvolvimento de lesões cariosas ($p<0.05$).

Com relação à exposição ao açúcar da dieta no processo da cárie, essa fornece os carboidratos, em especial a sacarose, que servem de substrato para a produção de ácidos que dissolvem os minerais dos tecidos dentários. A análise do diário de dieta nessa pesquisa evidenciou que a mamadeira açucarada noturna é um fator de bastante significância para a formação da cárie ($p=0,048$), pois à noite o fluxo salivar diminui e o açúcar fica em contato com os dentes por um longo período de tempo.

Com relação ao grupo redução de cárie, deve-se enfatizar que foi observado que os níveis de estreptococos do grupo mutans e de lactobacilos não sofreram alteração ($p > 0,05$). Já os níveis de microrganismos totais sofreram redução, entretanto, essa redução não foi significativa ($p = 0,080$). Esse resultado era esperado, pois os níveis de microrganismos estão intimamente relacionados com lesões de cárie. (Mattos-Graner et al.2001,

Conclusão:

Conclui-se que os níveis de lactobacilos no biofilme dentário apresentam-se fortemente associados ao desenvolvimento de novas lesões de cárie em pré-escolares de 3 a 4 anos..

Referências:

1. Assaf AV, de Castro Meneghim M, Zanin L, Tengan C, Pereira AC. Effect of different diagnostic thresholds on dental cáries calibration – a 12 month evaluation. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2006;34: 213–9.
2. Cárie dentaria, 2005. capítulo 3- A Microbiota Oral e Biofilmes formados sobre os dentes – de Marsh e Nyvad e editores Fejerskov e Kidd.
3. Drury TF, Horowitz AM, Ismail AI, Maertens MP, Rozier RG, Selwitz RH. Diagnosing and reporting early childhood cáries for research purposes. A report of a workshop sponsored by the National Institute of Dental and Craniofacial Research, the Health Resources and Services Administration, and the Health Care Financing Administration. *J Public Health Dent.* 1999 Summer;59(3):192-7.
4. Feitosa S, Colares V, Pinkham J. The psychosocial effects of severe cáries in 4-year-old children in Recife, Pernambuco, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2005; 21(5):1550-6.
5. Ferreira SH, Béria JU, Kramer PF, Feldens EG, Feldens CA. Dental cáries in 0- to 5-year-old Brazilian children: prevalence, severity, and associated factors. *Int J Paediatr Dent.* 2007;17(4):289-96.
6. Gift HC, Reisine ST, Larach DC. The social impact of dental problems and visits. *Am J Public Health.* 1992 Dec;82(12):1663-8.
7. Harris R, Nicoll AD, Adair PM, Pine CM. Risk factors for dental cáries in young children: a systematic review of the literature. *Community Dent Health.* 2004 Mar;21(1 Suppl):71-85.
8. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33:59-74..
9. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986 Dec;50(4):353-80.
10. Mattos-Graner RO, Zelante F, Line RC, Mayer MP. Association between cáries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-year-old Brazilian children. *Cáries Res.* 1998;32(5):319-23.
11. Moyers, R.E. *Handbook of Orthodontics.* Chicago: Year Book Medical Publishers; 1988.

12. Nobre dos Santos M, Melo dos Santos L, Francisco SB, Cury JA. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and cáries in the primary dentition. *Cáries Res.* 2002 Sep-Oct;36(5):347-52.
13. Oliveira LB, Sheiham A, Bönecker M. Exploring the association of dental cáries with social factors and nutritional status in Brazilian preschool children. *Eur J Oral Sci.* 2008;116(1):37-43.
14. Pereira AC. *Odontologia em Saúde coletiva.* 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.
15. Peretz B, Ram D, Azo E, Efrat Y. Preschool cáries as an indicator of future cáries: a longitudinal study. *Pediatr Dent.* 2003 Mar-Apr;25(2):114-8.
16. Ramos-Gomez FJ, Weintraub JA, Gansky SA, Hoover CI, Featherstone JD. Bacterial, behavioral and environmental factors associated with early childhood cáries. *J Clin Pediatr Dent.* 2002 Winter;26(2):165-73.
17. Rihs LB, Sousa Mda L, Cypriano S, Abdalla NM, Guidini DD, Amgarten C. Dental cáries activity in primary dentition, Indaiatuba, São Paulo, Brazil, 2004. *Cad Saude Publica.* 2007;23(3):593-600.
18. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental cáries. *Lancet.* 2007;369(9555):51-9.
19. Vachirarojpisan T, Shinada K, Kawaguchi Y, Laungwechakan P, Somkote T, Detsomboonrat P. Early childhood cáries in children aged 6-19 months. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004 Apr;32(2):133-42.
20. Vadiakas 2008
21. Mattos-Graner et al. 2001, *Cárie dentaria*, 2005. capítulo 3- A Microbiota Oral e Biofilmes formados sobre os dentes – de Marsh e Nyvad e editores Fejerskov e Kidd
 graner et al. 2001, *Cárie dentaria*, 2005. capítulo 3- A Microbiota Oral e Biofilmes formados sobre os dentes – de Marsh e Nyvad e editores Fejerskov e Kidd