

PATRÍCIA BASTOS DE VASCONCELLOS DE MEDEIROS

PERFIL SALIVAR DE UM GRUPO DE PRÉ-ESCOLARES
COM E SEM CÁRIE SEVERA DA PRIMEIRA INFÂNCIA

BRASÍLIA

2019

PATRÍCIA BASTOS DE VASCONCELLOS DE MEDEIROS

PERFIL SALIVAR DE UM GRUPO DE PRÉ-ESCOLARES
COM E SEM CÁRIE SEVERA DA PRIMEIRA INFÂNCIA

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^a Dr^a Soraya Coelho Leal

Coorientador: Prof. Dr. Walter Siqueira

BRASÍLIA

2019

PATRÍCIA BASTOS DE VASCONCELLOS DE MEDEIROS

PERFIL SALIVAR DE UM GRUPO DE PRÉ-ESCOLARES
COM E SEM CÁRIE SEVERA DA PRIMEIRA INFÂNCIA

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção
do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Aprovada em ____ de _____ de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Soraya Coelho Leal – Presidente
Universidade de Brasília

Denise Pinheiro Falcão da Rocha – Membro
Universidade de Brasília

Fernanda Cristina Garcia Pimentel - Membro
Universidade de Brasília

Maria do Carmo Machado Guimarães – Membro
Universidade de Brasília

Ana Cristina Barreto Bezerra – Suplente
Universidade de Brasília

*“Cultivar estados mentais positivos como a generosidade e a compaixão
decididamente conduz a melhor saúde mental e a felicidade”*

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Soraya Coelho Leal, minha orientadora, por seus ensinamentos, sua dedicação, motivação e competência. Agradeço não somente por buscar incansavelmente excelência no desenvolvimento deste estudo, mas, por aceitar o desafio de me orientar e por todo o tempo investido, sempre com amizade, alegria, paciência e presteza.

Ao Prof. Dr. Walter Siqueira, meu coorientador, por abrir as portas do “Siqueira Lab”, seu laboratório na Schulich School of Medicine & Dentistry na UWO, e colocar toda a sua infraestrutura e recursos à minha disposição, que me proporcionou uma excelente experiência no Canadá.

À agência CAPES por patronizar a realização da parte laboratorial da pesquisa, no Canadá, através do Programa de Bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior, enriquecendo ainda mais a presente investigação.

À Dra. Ana Cristina de Carvalho Rodrigues que participou de toda a coleta de dados do estudo no Centro de Educação Infantil 1 da Estrutural/DF e participou de importantes etapas deste estudo, além de compartilhar seus conhecimentos com muita dedicação.

Ao Dr. Italo de Macedo Bernardino pela análise estatística final e suas sugestões.

À Dra. Tereza Raquel Mourão de Oliveira, por toda colaboração e participação na realização de etapas importantes para obtenção dos resultados, contribuindo para o enriquecimento deste estudo.

Aos colegas do Siqueira Lab, David Zuanazzi e Karla Crosara, por me ensinarem e me ajudarem em muitos experimentos no laboratório e por me proporcionarem as melhores dicas de convivência no Canadá.

To Yizhi Xiao (Cindy), I thank you for all efforts and time dedicated to me for the accomplishment of the experiments contributing to the enrichment of this research.

Aos Membros da banca examinadora, Professoras Denise Pinheiro Falcão da Rocha, Fernanda Cristina Garcia Pimentel, Maria do Carmo Machado Guimarães e Ana Cristina Barreto Bezerra, que se dispuseram a compartilhar seus conhecimentos e suas contribuições para o enriquecimento deste estudo.

À Professora Ana Cristina Barreto Bezerra pela amizade e pelo apoio durante minha trajetória de estudo.

Às amigas, que me motivaram a cada momento de dificuldade e que, apesar da distância, durante minha estadia no Canadá, não permitiram que eu me sentisse sozinha, me enviando boas energias e palavras de carinho, fé e esperança. Em especial, Juliana de Aguiar Grossi, sempre me fazendo acreditar em mim mesma me mantendo forte para a conclusão deste estudo, e Maria José da Silva Figueirêdo Sé, sempre disposta a compartilhar seus grandes exemplos de vida.

À amiga do Siqueira Lab, Camila Regina Maciel Martins, que sempre me apoiou em todos os momentos de dificuldade e desafios dessa trajetória, e que comigo, compartilhou a luta para transpor os obstáculos de se estar em outro país e vivenciou experiências espetaculares no Canadá.

A todas as crianças que participaram da pesquisa, por me permitirem compartilhar de suas vidas e por me devolverem a confiança para a realização dos procedimentos propostos com coragem e respeito em meio a extrema ingenuidade! Agradeço por todas as experiências que me proporcionaram e por terem tornado possível a realização deste estudo.

Aos pais, diretores, professoras, auxiliares e demais profissionais envolvidos.

To Scott and Caylee, I thank you for the warmth, friendship and patience during this journey giving me courage to win every challenge.

Às minha filhas, Larissa Vasconcellos de Medeiros e Júlia Vasconcelos de Medeiros, que me acompanharam em todos os momentos dessa jornada. Que possam compreender, apesar de tão jovens e inocentes, e me perdoar por todos os instantes em que estive ausente para me dedicar ao trabalho, pois toda a minha luta se destina ao meu desejo de fazê-las felizes. Obrigada por constituírem a razão e o sentido da minha vida, com seus rostinhos, risadas, anseios e tanto amor.

Aos meus pais, José Carlos Penna de Vasconcellos e Lúcia Bastos de Vasconcellos, que me deram a vida, o amor, a educação e os melhores exemplos durante toda a minha formação.

Finalmente, meu agradecimento sincero a Deus, que está presente em todos os momentos da minha vida. A Deus, obrigada pelas bênçãos recebidas para a conclusão

de mais uma etapa na minha vida e pela graça de chegar até aqui com saúde, paz e perseverança.

RESUMO

A Cárie Severa da Primeira Infância (s-ECC) é um problema de saúde pública de alta prevalência e que afeta milhares de crianças em idade pré-escolar em todo o mundo. Por esta razão, faz-se necessário buscar formas de diagnóstico precoce da doença e/ou de identificar biomarcadores para a mesma. Assim, os objetivos deste estudo foram comparar o perfil da saliva total estimulada (SWS) e não-estimulada (UWS) de crianças livres de cárie com o daquelas com s-ECC antes e após tratamento odontológico. Para tanto avaliou-se pré-escolares com idade entre 48 e 71 meses com dentição primária completa. Um examinador calibrado registrou a presença e a atividade de cárie de acordo com o critério Nyvad para a formação de 2 grupos: grupo 1 (G1) - 41 crianças livres de cárie e grupo 2 (G2-t0) - 41 crianças com lesões de cárie cavitadas ativas em dentina. Coletou-se saliva total estimulada e não-estimulada. As crianças do G2-t0 receberam tratamento odontológico (G2-t1) e após 2 meses a saliva destas foi novamente coletada. O fluxo salivar, a concentração de proteínas totais e os pesos moleculares destas foram determinados, bem como a detecção da histatina. A análise dos dados incluiu estatística descritiva e comparações inter e intragrupos usando os testes de Mann-Whitney e de Wilcoxon. Foram aplicados o teste t de *Student*, para amostras pareadas, e regressão linear. O nível de significância foi fixado em 5%. Os resultados mostraram não haver diferença estatisticamente significativa entre as médias das idades do G1 (62,86; DP = $\pm 5,91$) e G2-t0 (61,00; DP = $\pm 6,70$) ($p = 0,562$). O número médio de superfícies de lesões de cárie cavitadas em dentina no G2-t0 foi de 6,84 ($\pm 1,32$). Quanto ao fluxo salivar, o G2-t0 apresentou 7 (17,07%) e 22 crianças (53,65%) com baixas taxas de fluxo estimulado ($< 0,6$ mL/min) e não-estimulado ($< 0,2$ mL/min), respectivamente. Após tratamento (G2-t1), este número foi reduzido para 2 (4,88%) em relação à SWS e para 9 (21,95%) em relação à UWS. Diferenças estatisticamente significantes na concentração de proteínas salivar entre G1 e G2-t0 ($p = 0,001$) e G2-t0 e G2-t1 ($p = 0,001$) foram observadas, mas não entre G1 e G2-t1 ($p = 0,368$). Ainda, foi observada maior frequência de proteínas de baixo peso molecular e histatina intacta no G1 em comparação ao G2-t0. Os pesos moleculares das proteínas presentes na saliva de G1 e G2-t1 foram semelhantes. Concluiu-se que o perfil proteico de crianças livres de

cárie apresentou um padrão diferente do das crianças com s-ECC e que a realização do tratamento odontológico foi capaz de minimizar estas diferenças. Além disso, a histatina foi mais frequentemente observada no G1 em comparação ao G2-t0 e G2-t1.

Palavras-chaves: Cárie dentária, Crianças, Proteômica, Histatinas, Proteínas, Diagnóstico.

ABSTRACT

Severe Early Childhood Caries (s-ECC) is a public health problem of high prevalence and affects thousands of pre-school children around the world. Therefore, there is a need to seek for ways to early diagnosis and/or to identify biomarkers for the disease. Thus, the aims of this study were to compare the profile of the stimulated whole-saliva (SWS) and unstimulated whole-saliva (UWS) of caries-free children from those with s-ECC before and after dental treatment. For this purpose, preschool children aged between 48 and 71 months, who presented complete primary dentition were evaluated. A calibrated examiner registered the presence and activity of dental caries according to the Nyvad criteria. Afterwards, 2 groups were formed: group 1 (G1) - 41 caries free children and group 2 (G2-t0) - 41 children presenting active cavitated dentine caries lesions. Stimulated whole-saliva (SWS) and unstimulated whole-saliva (UWS) were collected. The G2-t0 children received dental treatment (G2-t1) and 2 months after, their saliva was again collected. The salivary flow rate, total protein concentration, molecular weights, and the presence of histatin were determined. Data analysis included descriptive statistics. Intergroup and intragroup comparisons were made using Mann-Whitney and Wilcoxon's test. The Student's t-test for paired samples and linear regression were applied ($\alpha=0.05$). The results showed that there was no statistically significant differences between the mean ages of G1 (62.86; SD = 5.91) and G2-t0 (61.00; SD = 6.70) ($p = 0.562$). The mean number of surfaces of cavitated dentin carious lesions for G2-t0 was 6.84 (± 1.32). With respect to salivary flow, the G2-t0 showed 7 (17.02%) and 22 children (53.65%) with low stimulated (<0.6 mL/min) and unstimulated (<0.2 mL/min) flow rate, respectively. After treatment (G2-t1), this number was reduced for 2 (4.88%) for SWS and 9 (21.95%) for UWS. Significantly statistical differences were observed in salivary protein concentration between G1 and G2-t0 ($p = 0.001$) and G2-t0 and G2-t1 ($p = 0.001$), but not between G1 and G2-t1 ($p = 0.368$). A higher frequency of low molecular weight proteins and intact histatin was observed for G1 compared to G2-t0. The molecular weights of the proteins present in the saliva of G1 and G2-t1 were similar. It was concluded that the protein profile of caries-free children presented a different pattern from that of children

with s-ECC and that these differences were minimized by the dental treatment. In addition, histatin was more frequently observed in G1 than in G2-t0 and G2-t1.

Key words: Dental caries, Children, Proteomics, Histatins, Proteins, Diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – (a) e (b): crianças do grupo 1 com ausência de qualquer sinal de cárie (G1 - Nyvad código 0); (C) e (D): crianças do grupo 2 com presença lesão de cárie ativa em dentina (G2 - Nyvad código 3).....	38
Figura 2 - (a) e (b): coleta de saliva estimulada (SWS); (c) e (d): coleta de saliva não-estimulada (UWS).....	41
Figura 3 - (a) e (b): aplicação de verniz fluoretado em lesões de mancha branca ativas em esmalte de crianças do G2.....	42
Figura 4 - (a) lesão de cárie cavitada ativa em dentina no dente 73; (b) dente restaurado seguindo o protocolo TRA.....	44
Figura 5 - Concentração de proteína total das soluções-padrão em razão da absorbância diante dos padrões de albumina sérica bovina mostrando o desenvolvimento dos resultados das amostras de G1 nas coletas estimulada (a) e não-estimulada (b), G2-t0 nas coletas estimulada (c) e não-estimulada (d) e G2-t1 nas coletas estimulada (e) e não-estimulada (f).....	51
Figura 6 - (A) gel SDS-PAGE de G1, G2-t0 e G2-t1. Na faixa 1: padrão de albumina com pesos moleculares pré-determinados (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 e 250 kDa). Da faixa 2 a 5: quatro alíquotas com 20 µg de proteínas foram selecionadas de cada grupo. Os pesos moleculares foram expressos em kDa em intervalos variando até 250 (a: 0 a 20; b:> 20 a 40; c:> 40 a 60; d:> 60 a 80; e:> 80 a 100; f:> 100 para 120; g> 120 a 140; e h:> 140 a 160 kDa). (B) Medidas de densidade óptica das pistas de gel SDS-Page mostrando os picos de densidade em relação aos pesos moleculares do padrão de albumina.....	55
Figura 7 - Imagem de eletroforese em gel catiônico corado com azul de Coomassie. Na coluna da esquerda estão os padrões de histatina 1, 3 e 5 corados. Nas outras colunas são amostras de G1 e G2 (antes e depois de receber tratamento). As setas mostram bandas coradas em regiões correspondentes à histatina.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Definição de Cárie Severa da Primeira Infância de acordo com a idade segundo a <i>American Academy of Pediatric Dentistry</i>	31
Tabela 2 - Critério Nyvad com seus códigos e descritores.....	37
Tabela 3 – Distribuição dos códigos Nyvad de cárie em crianças do G2.....	49
Tabela 4 – Taxas de fluxo salivar para a saliva total estimulada e não-estimulada de G1, G2-t0 e G2-t1.....	50
Tabela 5 – Concentração de proteínas observada na SWS (<i>Stimulated whole-saliva</i>) e UWS (<i>Unstimulated whole-saliva</i>) em G1, G2-t0 e G2-t1.....	53
Tabela 6 – Pesos moleculares (PM) das proteínas detectadas no G1, G2-t0 e G2-t1 em intervalos pré-estabelecidos de 20 kDa.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPD – *American Association of Paediatric Dentistry*

Acidic PRPs – *Salivary acidic Proline-rich phosphoprotein*

AEP- *Acquired Enamel Pellicle*

ART- *Atraumatic Restorative Treatment*

BCA – *Bicinchoninic Acid*

BME – Beta-mercaptanoetanol

BR – Brasil

Ca⁺⁺ - Íon Cálcio

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

cm – Centímetros

cm² – Centímetro quadrado

°C – Graus *Celcius*

DTT – *Dithiothreitol* – Ditiotreitól

ECC – *Early Childhood Caries*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

et al – E colaboradores

EUA – Estados Unidos da América

g - Gramas

G1 – Grupo de crianças livres de Cárie

G2 – Grupo de crianças com Cárie severa da primeira infância

G250 – Azul-de-Coomassie

h – horas

HIS1 – Gene que expressa a proteína Histatina 1

HIS2 - Gene que expressa a proteína Histatina 3

IBM corp. - *International Business Machines Corporation*

IgA – Imunoglobulina A

IgD – Imunoglobulina D

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL – *Illinois*

Inc. – *Incorporation*

JPEG - Formato para compactar arquivos de imagem

KDa - Kilodaltons

mg – Miligramas

MG – Minas Gerais

mg/mL – miligramas por mililitros

min – Minutos

mL – Mililitros

mL/min – Mililitros por minuto

mM – milimol

NIDCR - *National Institute of Dental and Craniofacial Research*

nm – Namômetro

NY – *New York* (Nova York)

OMS – Organização Mundial de Saúde

ON – *Ontario*

p – Valor de p (probabilidade calculada em estatística)

pH – Valor que exprime a acidez ou a alcalinidade de uma solução

R² – Coeficiente de determinação

SC – Santa Catarina

SDS - *Sodium-dodecyl-sulfate* – Dodecil sulfato de sódio

SDS PAGE – *Sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

s-ECC – *Severe Early Childhood Caries* – Cárie severa da primeira infância

SPSS – *Statistical Package for the Social Science*

SWS – *Stimulated whole-saliva*

t – teste t de Student (teste estatístico)

TRA - Tratamento Restaurador Atraumático

tris – Hidroximetil

tris-Cl – Ácido hidrocloreídrico UWS – *Unstimulated whole-saliva*

UK – United Kingdon

USA – *United States of America*

UWO – *University of Western Ontario*

V – Volts

vs – *Versus*

W – Watts

WSSs – *Whole-saliva supernatants*

x g – Rotações

µg/mL – Microgramas por mililitros

µg - Microgramas

µL – Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 PELÍCULA ADQUIRIDA DO ESMALTE.....	23
2.2 SALIVA.....	24
2.2.1 Fluxo salivar	25
2.2.2 Proteínas salivares	26
2.3 MÉTODOS DE ANÁLISES PROTEÔMICAS EM SALIVA.....	28
2.3.1 Concentração de proteínas total	28
2.3.2 Eletroforese	29
2.4 CÁRIE DA PRIMEIRA INFÂNCIA.....	31
2.4.1 Cárie dentária e saliva	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4 MÉTODOS	35
4.1 PARTE I: PROCEDIMENTOS REALIZADOS NO BRASIL.....	35
4.1.1 Aspectos éticos	35
4.1.2 Delineamento e Seleção da amostra	35
4.1.3 Exame físico intra-bucal	36
4.1.4 Coleta de saliva	39
4.1.5 Tratamento restaurador atraumático	41
4.1.6 Reavaliação do G2	44
4.1.7 Procedimento de adequação e armazenamento das amostras	44
4.2 PARTE II: PROCEDIMENTOS REALIZADOS NO CANADÁ.....	45
4.2.1 Preparo das amostras para realização dos experimentos laboratoriais ...45	
4.2.2 Experimento 1: Ensaio do ácido bicinconínico (<i>Bicinchoninic acid assay - BCA</i>)	45
4.2.3 Experimento 2: SDS-PAGE (<i>Sodium-Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Acid Assay</i>) - Gel de Eletroforese	46

4.2.4 Experimento 3: Gel Nativo Catiônico	47
4.2.5 Imagens: <i>Bio-Rad Image Lab</i>	48
4.2.6 Análise estatística	48
5 RESULTADOS	49
5.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA.....	49
5.2 PERFIL DA CÁRIE DENTÁRIA.....	49
5.3 FLUXO SALIVAR.....	50
5.4 PERFIL PROTÉICO.....	51
6 DISCUSSÃO	5
7 CONCLUSÕES	61
7.1 CONCLUSÕES GERAIS.....	61
7.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.....	61
REFERÊNCIAS	62
APÊNDICES	71
APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PÁGINAS 1 E 2).....	71
APÊNDICE 2 – TERMO DE ASSENTIMENTO.....	73
APÊNDICE 3 - FICHA PRÓPRIA.....	74
ANEXOS	75
ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA – FS/UNB (PÁGINAS 1 A 6).....	75
ANEXO 2 – TERMO DE ANUÊNCIA DA SECRETARIA DE ESTADO EDUCAÇÃO DO DISTRITO FEDERAL (PÁGINAS 1 E 2).....	81

1 INTRODUÇÃO

A Cárie da Primeira Infância (ECC – *Early Childhood Caries*) é uma forma agressiva da doença com etiologia multifatorial. Quando associada a fatores de risco sócio-culturais, ambientais, comportamentais (1) e biológicos (2) pode se desenvolver logo após a erupção dos dentes decíduos em superfícies consideradas de baixo risco (3). O não diagnóstico e tratamento adequados promovem rápida progressão e podem afetar de forma negativa e permanente o desenvolvimento psico-social e físico da criança, com consequente danos tanto às dentições decídua e permanente, quanto à saúde sistêmica da criança (4,5).

A ECC é mundialmente reconhecida como a doença mais prevalente na população infantil, com estimativas que indicam ser cinco vezes mais comum que a asma, quatro vezes mais que a obesidade infantil e vinte vezes mais que a Diabetes mellitus (4). Por esta razão, o NIDCR (*National Institute of Dental and Craniofacial Research*), sugeriu, em 1998, a inclusão do termo “Severo” para melhor definir este padrão de lesão de cárie (3). Assim, em 2011, a AAPD (*American Academy of Pediatric Dentistry*), definiu como Cárie Severa da Primeira Infância (s-ECC – *Severe Early Childhood Caries*) qualquer sinal de lesão cariiosa em qualquer superfície dentária em crianças com menos de 3 anos de idade, incluindo-se lesões iniciais em esmalte.

A cárie dentária é um processo patológico dinâmico, biofilme-dependente, resultado de complexas interações entre os microrganismos bucais (e seus produtos), constituintes salivares e carboidratos da dieta (6,7). A dinâmica do biofilme acelular formado por proteínas, carboidratos e lipídios, que, via adsorção seletiva de proteínas derivadas do fluido bucal constitui a Película Adquirida do Esmalte (AEP- *Acquired Enamel Pellicle*) (8), torna óbvia a relação entre a saliva e as interações complexas que ocorrem na superfície do esmalte dentário.

Nas últimas quatro décadas, estudos microbiológicos têm permitido melhor compreensão da complexidade da microbiota associada com infecções bucais por meio da análise do proteoma e peptidoma da saliva humana (9). Os mais recentes avanços tecnológicos de investigação e análise da composição salivar revolucionaram tal conhecimento. Outrossim, atribuiu-se às proteínas que compõem a saliva o papel

diagnóstico e terapêutico para prevenção, controle do desenvolvimento e tratamento das doenças bucais (10).

Dados referentes à cárie dentária mostram ser esta a doença não comunicável de maior prevalência no mundo que afeta cerca de 3 bilhões de pessoas entre crianças e adultos (11). Estes dados indicam a necessidade de se buscar meios de diagnóstico precoce da doença, o que faz da pesquisa sobre a composição salivar um potencial instrumento para a determinação de biomarcadores salivares (12,13), indicadores tanto para a saúde quanto para o risco e prognóstico de doenças, entre elas a cárie dentária. Muito já se avançou neste campo, com descobertas inovadoras, como as mais recentes, sobre o desenvolvimento de proteínas sintéticas (14) com fins de diagnóstico e proposta terapêutica (15) para as doenças bucais.

O impacto da assistência odontológica na redução da prevalência da cárie dentária tem permitido o monitoramento da doença em crianças. A priorização da atenção a determinados grupos etários se baseia na associação entre a experiência de cárie na dentição decídua e a experiência futura na dentição permanente (16). Estudos apontam para a efetividade de programas educativos que visam o aconselhamento de famílias e comunidades quanto aos bons hábitos de dieta e higiene bucal na redução do risco da cárie nestas populações (17,18). Porém, a prevenção aliada à terapia da doença ainda na dentição decídua, apesar de constituírem boas alternativas para o seu efetivo controle (19), têm se mostrado limitadas quando o problema é analisado do ponto de vista populacional.

Considerando o acima exposto, este estudo teve por objetivo investigar o perfil salivar de crianças que, apesar de terem estilos de vida muito semelhantes, apresentaram ou não cárie severa da primeira infância. Ainda, determinar se o tratamento odontológico seria capaz de influenciar as características salivares pós-tratamento. Desta forma, as hipóteses nulas formuladas foram:

- Não existe diferença no perfil salivar de crianças não portadoras e portadoras de cárie severa da primeira infância;
- Não existe diferença no perfil salivar de crianças com cárie severa da primeira infância antes e após receberem tratamento odontológico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PELÍCULA ADQUIRIDA DO ESMALTE

A película adquirida do esmalte consiste predominantemente de proteínas salivares e peptídeos, além de derivados não-salivares, carboidratos e lipídeos que formam uma interface protetora entre a superfície do esmalte dentário e o meio bucal (8,20). Tal estrutura atua como barreira permeável seletiva que regula a desmineralização e remineralização do tecido dentário, resposta anti-inflamatória a possíveis agressões, atividade antimicrobiana e adsorção proteica (10). Existe evidência de que segundos após o primeiro contato entre a saliva e a superfície dentária, proteínas salivares com alta afinidade pela hidroxiapatita iniciam o processo de interação eletrostática com a superfície do esmalte (12,21).

As primeiras proteínas a interagirem com a hidroxiapatita possuem baixo peso molecular e podem ser classificadas como proteínas com afinidade de ligação aos íons cálcio e fosfato (proteínas precursoras) (9). O segundo estágio de maturação da película ocorre com a adsorção de proteínas salivares atribuídas pelas interações proteína-proteína, fase responsável pelo seu rápido aumento em espessura (100-1000 nm), presença de moléculas com formas complexas e maior peso molecular podendo ser caracterizada pela formação de sucessivas camadas proteicas ligadas às proteínas “precursoras” adsorvidas na superfície do esmalte (20).

A partir da fragmentação trípica de dois diferentes peptídeos derivados da mesma proteína por meio da análise de espectrometria de massa foram identificadas cerca de 130 proteínas da película adquirida do esmalte de dentes permanentes (9,10). Poucos anos depois, as histatinas, estaterinas e proteínas ácidas ricas em prolina foram apontadas como as proteínas mais importantes da AEP, com importantes propriedades, como a alta afinidade pela hidroxiapatita e a facilidade de serem clivadas pelas enzimas proteolíticas encontradas na saliva (14). Em relação à dentição decídua, sabe-se que as proteínas salivares mais abundantes da película adquirida são semelhantes às encontradas na película de dentes permanentes (12). Porém, em 2013, um estudo (10) identificou 76 proteínas diferentes na AEP da primeira dentição, com características

peculiares tais como, alta seletividade no processo de adsorção, baixo conteúdo enzimático e múltiplos modos de interação, guardando alta afinidade de se ligar tanto com íons Ca^{++} (cálcio) quanto com outras proteínas.

Acredita-se que as diferenças estruturais entre os cristais de hidroxiapatita do esmalte de dentes permanentes e decíduos (22,23), como angulação dos cristais e composição do esmalte podem explicar a presença de diferentes proteínas na AEP na primeira dentição. As proteínas recém-descobertas do proteoma da AEP de dentes decíduos (10), tais como *Acidic PRPs* (*Salivary acidic proline-rich phosphoprotein*), histatinas e estaterinas foram caracterizadas por possuírem pesos moleculares e tamanhos extremamente baixos. Mais de 2/3 dos peptídeos da película adquirida de dentes decíduos exibem carga positiva em pH neutro que reforçam a propriedade de serem adsorvidas diretamente à hidroxiapatita e outros constituintes da película (22). Outra importante descoberta sobre o proteoma de dentes decíduos refere-se ao fato de exibirem características hidrofóbicas, que contribuem com a capacidade de realizarem ligações inter-peptídeos e proteína-peptídeos (10). Além disso, possuem atividade antimicrobiana, lubrificadora, de regeneração tecidual, de resposta imunológica e de biomineralização (24).

Segundo Jayaraj e Ganesan, 2015 (5), algumas proteínas e peptídeos componentes da película de decíduos exibem capacidade tampão, resposta imune e/ou anti-inflamatórias que permitem a defesa contra agentes patógenos. Outrossim, a identificação de proteínas com múltiplas propriedades é de grande interesse para a pesquisa proteômica, pois, de tais proteínas/peptídeos pode-se obter sequência de aminoácidos. Assim, viabilizassem a produção, em laboratório, de proteínas sintéticas com finalidades diagnóstico/terapêuticas específicas promissoras (25), mas que ainda requerem muita investigação (26).

2.2 SALIVA

A saliva total é constituído pela secreção de glândulas salivares maiores e menores, fluido crevicular cervical, constituintes séricos, células epiteliais descamadas, muco proveniente da orofaringe e microrganismos (26, 27). As glândulas salivares

maiores (parótida, submandibular e sublingual) são responsáveis pela secreção de 90% do total da saliva presente na cavidade bucal. São conhecidas por secretar um fluido transportado a partir do soro proveniente dos tecidos circundantes, enquanto as glândulas menores labiais, bucais, linguais e palatinas fornecem os 10% do total de saliva restante (27). Este transporte seletivo é regulado por células epiteliais tubulares no interior das glândulas secretoras, que, extremamente permeáveis e envoltas por capilares, são inervadas de forma autônoma, sujeitas às estimulações simpática e parassimpática (28).

Em relação às funções salivares, sabe-se que a saliva é um fluido complexo que exerce múltiplas funções na cavidade bucal: digestão, paladar, lubrificação dos tecidos bucais e dentários, deglutição, além de agir como barreira protetora contra agentes patogênicos (25). Com um pH neutro a ligeiramente básico ($\text{pH } 7,42 \pm 0,4$) (29) e heterogêneo, o biofluido incolor salivar é composto por água (99%), substâncias inorgânicas (0,2%) e proteínas (0,3%) além de outras substâncias orgânicas (27). As substâncias inorgânicas da saliva são: sódio, potássio, cálcio, cloro, bicarbonato, fosfato inorgânico, tiocianato, flúor, compostos iodados e magnésio. Os componentes orgânicos principais são as proteínas, principalmente mucina e ptialina ou alfa-amilase (enzima digestiva), além da albumina, lisozima, gamaglobulinas e uréia, bem como vitaminas, aminoácidos, amônia, glicose, lactose, citratos, fatores intrínsecos da coagulação e imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM, IgD e IgE) (30). A saliva apresenta capacidade tampão que desempenha importante papel na susceptibilidade à desmineralização, remineralização e resistência do esmalte à cárie dentária (5).

2.2.1 Fluxo salivar

As variações do fluxo salivar podem, dependendo da situação, ser causa ou efeito de processos patológicos bucais ou sistêmicos (30). As listas de possíveis causas de hipossalivação e sialorréia são extensas, entretanto, inúmeras dificuldades técnicas constituem limitações das pesquisas que visam determinar as variações do fluxo, de modo que, as investigações nem sempre são conclusivas e as relações de causa e efeito não estão perfeitamente estabelecidas (28).

Segundo Siqueira e Nicolau, 2002 (31), o fluxo salivar normal é responsável pela função protetora da saliva e, conseqüentemente, está relacionado com as condições de saúde do meio bucal. O aumento do fluxo salivar eleva a capacidade tampão da saliva devido ao aumento da concentração de bicarbonato aumenta o pH da saliva e conseqüentemente potencializa o efeito remineralizador e protetor da saliva em relação aos dentes (32).

Apesar da grande variabilidade da taxa de fluxo salivar reportada entre indivíduos, estudos concordam que a média do fluxo salivar normal não-estimulado ou em repouso pode variar de 0,3 a 0,5 mL/min (31,27), que de 0,2 até 0,3 mL/min pode ser considerado um fluxo baixo e que menor que 0,2 mL/min pode ser considerado extremamente baixo (33). Para a saliva estimulada considera-se normal o fluxo salivar de 1 até 2 mL/min, baixo entre 0,6 e 1 mL/min e extremamente baixo, o fluxo menor que 0,6 mL/min (32,34,35).

2.2.2 Proteínas salivares

A saliva total é composta por um grande número de proteínas e peptídeos, cuja complexidade depende das funções biológicas específicas desempenhadas por elas e pelos compostos que formam (36). As concentrações das proteínas podem variar de acordo com a glândula secretora, inervação e estimulação envolvidos na sua produção (37).

As proteínas salivares e os complexos formados por elas possuem importantes características: multifuncionalidade, redundância e antifuncionalidade (38). A multifuncionalidade consiste na propriedade de uma única molécula possuir capacidade de exercer mais de uma função na cavidade bucal, enquanto a redundância confere uma mesma função biológica a mais de uma molécula. A antifuncionalidade é a propriedade de uma proteína, ou complexo por ela formado, de agir de forma favorável ou contrária ao hospedeiro (39).

Dentre as proteínas encontradas na saliva, a alfa amilase ou amilase salivar é a mais abundante, apresentando características multifuncionais de proteção quando suspensas na saliva, por agregar certos tipos de bactérias (tais como certos tipos de

Streptococcus) para serem posteriormente digeridas e deglutidas, bem como, possuem função de digerir moléculas de amido e de promoção de aderência de bactérias à superfície do esmalte quando ligadas à AEP. Nesse sentido, podem fazer parte do processo de formação e espessamento do biofilme garantindo fornecimento de alimento às bactérias cariogênicas, auxiliando, assim, no desenvolvimento da cárie dentária (40). Com função de defesa física, as mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular que atuam na agregação de bactérias, vírus e substâncias nocivas, agindo como barreira protetora na superfície dos tecidos moles e duros (41).

As lisozimas são proteínas que atuam em peptidoglicanos da parede celular de bactérias promovendo sua lise e possuem capacidade de se ligar a lipopolissacarídeos bacterianos, garantindo proteção contra a ação destrutiva tecidual (42). Já as imunoglobulinas produzidas tanto pelas glândulas salivares maiores e menores, estão subdivididas em diferentes tipos - IgA, IgG e IgM. As imunoglobulinas conferem capacidade de proteção do hospedeiro contra a adesão bacteriana aos tecidos bucais e facilitando a ação de outros mecanismos de defesa (43).

As histatinas são constituídas por peptídeos catiônicos, compostas pelo aminoácido histidina, de baixo peso molecular. Atuam em processos variados relacionados à defesa, tais como, inibição de processos inflamatórios, proteção do esmalte contra desmineralização e apresentam, ainda, atividades antifúngica e antibacteriana (44). Possuem três formas principais que são as histatinas 1, 3 e 5 que diferem entre si pela forma como são produzidas, já que a 1 e 3 surgem pela expressão gênica dos genes HIS1 e HIS2, enquanto a histatina 5, de modificações pós-translacionais a partir da histatina 3 (45). Estudos recentes evidenciaram que as histatinas possuem propriedades de adesão à película adquirida e à hidroxiapatita, mantendo-se protegidas dos processos de proteólise (44) e passando a apresentar potencial anti-fúngico (46).

As esterinas e proteínas ricas em prolina estão presentes e participam da formação da AEP (8). Possuem atividade antibacteriana pela propriedade de se ligarem a glicoproteínas de bactérias o que facilita sua aglutinação para posterior deglutição pelo hospedeiro, e antifúngica, ao induzir a redução da agressividade da *Candida Albicans* (42). A esterina, em particular, é uma proteína que se mantém intacta quando ligada à

superfície do esmalte como parte da AEP (12). Ela se destaca de outras proteínas por possuir dois diferentes mecanismos de controle dos fosfatos de cálcio na saliva: 1- inibição da precipitação espontânea dos sais de cálcio; 2- inibição do crescimento dos cristais de cálcio (21). As PRPs, por outro lado, possuem fosfoserinas em seu conteúdo que, como resultado de modificações pós-traducionais, lhes conferem alta afinidade pela hidroxiapatita (45).

As PRPs têm sido descritas como proteínas iniciadoras relacionadas aos fenômenos de remineralização que ocorrem nas superfícies dos dentes no estado de supersaturação de cálcio na saliva (46).

Por fim, as cistatinas são inibidores de proteinases do aminoácido cisteína, com grande capacidade de ligação ao cálcio (41). Supõe-se, pelas concentrações elevadas em condições patológicas, em especial da cistatina C, que estejam relacionadas aos processos de desmineralização e remineralização do esmalte dentário. Embora seu papel na doença cárie não tenha sido definido, especula-se que seus níveis possam estar aumentados na presença de lesões cariosas ativas. (47).

2.3 MÉTODOS DE ANÁLISES PROTEÔMICAS EM SALIVA

2.3.1 Concentração de proteínas totais

Os métodos para medição da concentração de proteínas totais são colorimétricos. Tais procedimentos consistem em reações químicas entre reagentes compostos associados à solução-teste e a soluções de referência (48), cuja coloração dos produtos é quantificada e comparada com a solução padrão de concentrações pré-estabelecidas (49).

Na literatura, os métodos colorimétricos de mensuração da concentração de proteínas mais conhecidos são os métodos de Bradford, de Lowry e o de Smith ou do ácido bicinconínico (BCA, *Bicinchoninic Acid Protein Assay*) (49). O primeiro consiste em reações que confrontam a solução investigada com a solução-padrão de albumina sérica bovina, por meio da coloração de Azul-de-Coomassie G250. Isto pode levar a resultados pobres, pela extrema dependência da reação entre o Azul-de-Coomassie e as proteínas, subestimados pelas reações de menor rendimento dependendo do tipo de aminoácido

nelas contido (50). Os outros dois métodos, de Lowry e BCA, utilizam reações entre íons de cobre com as ligações peptídicas das proteínas. No método de Lowry, as ligações proteína-íons cobre são pigmentadas pelo azul de heteropolimolibdênio e a coloração azul é medida a 550 nm (51). No método de Smith, ou BCA, a reação produz coloração roxa mensurada a 562 nm (52) com as vantagens da reação ocorrer mais facilmente, exigir menos passos operatórios e ter grande aplicabilidade por ser mais tolerante a diferentes substâncias, tais como, tampões, drogas, ácidos nucleicos e açúcares (51).

2.3.2 Eletroforese

A eletroforese em gel é uma técnica amplamente usada para a separação de biomoléculas, tais como os ácidos nucleicos e as proteínas. São métodos analíticos constituídos pela reação de polimerização da acrilamida e da metilenobisacrilamida, induzida por radicais livres, que apresentam poros de dimensões moleculares compondo malhas. Nessas malhas de gel, em resposta ao campo elétrico do meio, moléculas carregadas eletricamente sofrem separação, baseada tanto nos princípios da filtração em gel quanto na mobilidade eletroforética das moléculas. Nesse sentido, as grandes moléculas têm sua migração retardada com relação às moléculas de menor tamanho (49). A eletroforese pode ser classificada em dois tipos principais: os métodos desnaturantes e os nativos.

O método desnaturante, cuja separação de proteínas desnaturadas ocorre de acordo com seu peso molecular e pode ser utilizado também como método de filtragem de proteínas (50), é a eletroforese em gel de poli(acrilamida adicionado de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE, *sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) (53). A técnica realiza a desnaturação e dissociação das amostras submetidas aos reagentes e à fervura provocando o rompimento de estruturas secundárias a quaternárias deixando-as somente com a estrutura primária, composta por sequência de aminoácidos (49). Os reagentes utilizados, ditioneitol (DTT - *Dithiothreitol*) e o β-mercaptoetanol, promovem a desnaturação das proteínas que se ligam ao dodecil sulfato de sódio (SDS) e passa a ter forma retilínea e cargas elétricas proporcional ao seu peso molecular (51). Desta maneira, o processo de separação molecular da SDS-PAGE torna possível a estimativa de peso molecular por meio da comparação dos pesos encontrados nas

amostras testadas com soluções de referência, com proteínas de pesos moleculares conhecidos (54). A quantificação das proteínas é feita pela análise densitométrica da intensidade da cor das bandas eletroforéticas na imagem obtida do gel de eletroforese com *softwares* que possuem recursos de medição de intensidade, tal como o *Bio-Rad Image Lab* (55).

Nos métodos nativos as proteínas são submetidas à atração eletroforética em sua forma original sendo separadas por outros fatores e não pelo peso molecular. A eletroforese em gel nativo é empregada quando se pretende identificar proteínas por meio de propriedades biológicas específicas, tais como, ligações com receptores ou anticorpos, atividade enzimática, presença de complexos e presenças de cargas elétricas positivas ou negativas. Os géis nativos catiônicos são utilizados para o estudo das proteínas catiônicas, especialmente as histatinas e outras proteínas ricas em histidinas (56). Essa técnica difere da SDS-PAGE por realizar a eletroforese com proteínas em sua forma nativa e com o sistema eletroforético montado de forma que o catodo (pólo negativo) fique na posição inferior. Outra diferença é a especificidade do gel de poliacrilamida e das soluções-tampão, no qual a solução tampão-superior, interna ao cassete, difere da inferior, externa a ele, constituindo um método descontínuo de eletroforese (57).

Os métodos eletroforéticos possuem, de modo geral, limitações relacionadas à seleção dos reagentes, ao método de separação ou de coloração das bandas eletroforéticas. Quanto à separação, o fato desta ser obtida por meio de uma única característica da molécula, tal como peso molecular, fazendo com que diferentes moléculas apareçam dispostas nos mesmos níveis de separação, ou seja, nas mesmas bandas eletroforéticas, pode ser considerada uma limitação (58). Nos géis nativos, a presença de mucina, proteína de alto peso molecular, é capaz de formar complexos com outras moléculas, o que pode impedir a passagem destas pelos poros do gel (59). Apesar das limitações, alguns estudos (38,41) empregam géis nativos de eletroforese para a identificação e caracterização de proteínas como amilase, histatinas e proteínas ricas em histidinas na saliva, enquanto outros (60,61,62), utilizam o gel SDS-PAGE para encontrar possíveis diferenças entre bandas proteicas de amostras de saliva de indivíduos sadios e indivíduos portadores da doença cárie dentária.

2.4 CÁRIE DA PRIMEIRA INFÂNCIA

A cárie dentária ainda hoje representa um grande problema para a saúde pública mundial (63,64), já que é a doença crônica mais comum na infância. No Brasil, o último levantamento epidemiológico nacional em saúde bucal que considerou a faixa etária de 18 a 36 meses (65) encontrou uma prevalência de cárie dentária de 26,85%. Outros estudos indicam uma variação entre 12% a 46%, sendo que a faixa etária mais acometida pela doença é a de 1 a 3 anos de idade (66,67).

Em 2011, a AAPD (*American Academy of Pediatric Dentistry*) definiu como Cárie Severa da Primeira Infância (s-ECC – *Severe Early Childhood Caries*) qualquer sinal de lesão cariiosa em qualquer superfície dentária em crianças com menos de 3 anos de idade, incluindo-se lesões iniciais em esmalte. Para as idades entre 3 a 5 anos, a s-ECC segue a descrição conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1. Definição de Cárie Severa da Primeira Infância de acordo com a idade segundo a *American Association of Pediatric Dentistry* (5,68)

Idade	Descrição
3 anos	Uma, ou mais, superfícies cavitada, restaurada ou dente perdido por cárie na região ântero-superior ou um escore ceos* \geq 4
4 anos	Uma, ou mais, superfícies cavitada, restaurada ou dente perdido por cárie na região ântero-superior ou um escore ceos \geq 5
5 anos	Uma, ou mais, superfícies cavitada, restaurada ou dente perdido por cárie na região ântero-superior ou um escore ceos \geq 6

*ceos = superfícies cariadas, indicadas para extração, obturadas

Apesar da agressividade e rápida progressão, a doença pode ser prevenida, controlada ou mesmo revertida. Para tal, o diagnóstico deve ocorrer no estágio inicial, determinado pela presença de mancha branca no esmalte dentário (16). Em estágio mais avançado, com presença de cavitação, há necessidade de tratamento curativo a

fim de evitar a progressão da doença para situações de destruição completa do dente, o que pode resultar em complicações locais, sistêmicas, psicológicas e sociais (17).

Diferentes sistemas visuais-táteis de classificação para a detecção de lesões de cárie em estágios iniciais têm sido propostos e desenvolvidos (69). Entretanto, a determinação da atividade de cárie, apesar de ser extremamente importante na tomada de decisão clínica, não é levada em consideração pela maioria dos índices, sendo o critério Nyvad o único método validado para se classificar as lesões cariosas em ativas e inativas (70). Neste método, as superfícies dentárias são avaliadas quanto à presença ou não da doença e, caso uma lesão seja detectada, se esta está ativa ou inativa. Considerando que a ECC é definida com base, também, na presença de lesões não-cavidades, este método de diagnóstico permite determinar com maior segurança crianças livres de cárie, definidas neste estudo como aquelas que não apresentam nenhum sinal clínico da presença e atividade da doença.

Quanto aos tratamentos propostos para o manejo clínico da s-ECC, destaca-se o Tratamento Restaurador Atraumático (ART: *Atraumatic Restorative Treatment*). O ART foi desenvolvido pelo Dr. Jo E. Frencken (Universidade de Nijmegen, Holanda) e sua equipe, em meados dos anos 80. Esta técnica restauradora empregada em lesões dentinárias, raramente requer o uso de anestesia local, dispensa isolamento absoluto e uso de instrumentos rotatórios (71). É uma modalidade alternativa no tratamento bucal preventivo e curativo da cárie dentária para grupos de populações com vulnerabilidade social (72,73).

A técnica do ART aumenta a probabilidade de cooperação do paciente, reduz o tempo operatório, evita as fobias relacionadas a punções, ruídos e vibrações e, conseqüentemente, gera menor ansiedade (74).

2.4.1 Cárie dentária e saliva

Várias tentativas de se relacionar saliva e cárie dentária já foram feitas. A hipossalivação foi apontada como um fator de risco à cárie em função da redução da capacidade tampão, e por conseguinte, do pH do meio. Ademais, por promover o espessamento do biofilme, com incorporação de proteínas complexas e derivados ácidos provenientes de agentes patógenos (27). Em um outro estudo, uma relação

inversamente proporcional entre fluxo salivar e o risco à cárie também foi observada, de maneira que quanto menor o fluxo, maiores as chances de ocorrência da doença (28).

De acordo com um estudo usando métodos de análises proteômicas de saliva de pré-escolares, proteínas de baixo peso molecular equivalente ao das cistatinas, foram associadas à suscetibilidade destes à cárie severa (47).

Uma investigação sobre crianças brasileiras portadoras de s-ECC relacionou o risco de cárie com as variações na expressão de α -amilase e anidrase carbônica (75). Além disso, um estudo realizado com crianças chinesas que apresentavam lesões de cárie antes e após receberem tratamento sugeriu que picos significativos de peptídeos formados por segmentos de histatina 1 estariam associados ao risco de s-ECC (76). Alguns estudos, porém, não encontraram diferenças significativas ao compararem grupos com e sem s-ECC (61,62).

A identificação de proteínas com múltiplas propriedades é de grande interesse para a pesquisa proteômica que pretende utilizar os mais recentes avanços em nanotecnologia para determinar possíveis biomarcadores na saliva de indivíduos saudáveis e doentes (77,78). Portanto, a análise proteômica parece promissora e se justifica pela possibilidade de constituir ferramenta diagnóstica que poderia contribuir com o rastreio do risco e monitoração do desenvolvimento da doença em estágio precoce, porém ainda requer maior investigação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o perfil proteico da saliva estimulada e não-estimulada em crianças livre de cárie e com a presença de cárie severa da primeira infância, antes e após receberem tratamento odontológico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a concentração de proteínas da saliva estimulada e não-estimulada de crianças livres de cárie e com a presença de cárie severa da primeira infância.
2. Determinar a concentração de proteínas da saliva estimulada e não-estimulada de crianças com cárie severa da primeira infância antes e após receberem tratamento odontológico.
3. Determinar o fluxo salivar da saliva estimulada e não-estimulada de crianças livres de cárie e com a presença de cárie severa da primeira infância, antes e após receberem tratamento odontológico.
4. Determinar os pesos moleculares da saliva estimulada e não-estimulada de crianças livres de cárie e com a presença de cárie severa da primeira infância.
5. Determinar os pesos moleculares da saliva estimulada e não-estimulada de crianças com cárie severa da primeira infância antes e após receberem tratamento odontológico.

4. MÉTODOS

4.1 PARTE I: PROCEDIMENTOS REALIZADOS NO BRASIL

4.1.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (CEP/FS-UNB), número de registro (CAAE) 47603415.5.0000.0030 (anexo 1) e foi realizado com o apoio da Secretaria de Educação do Distrito Federal (anexo 2).

Todos os procedimentos foram realizados somente após os pais assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice 1) e as crianças, o termo de assentimento (apêndice 2).

Todas as crianças que participaram da triagem inicial e calibragem (página 37) e que foram identificadas como portadoras de cárie foram tratadas, incluindo aquelas que não cumpriram os critérios de inclusão, desde que os pais tivessem assinado o termo de consentimento livre e esclarecido. Finalmente, mães e/ou responsáveis pelos participantes da pesquisa forneceram informações sobre hábitos alimentares e uso de medicamentos e receberam orientação sobre dieta (redução da ingestão de açúcar) e higiene bucal.

4.1.2 Delineamento e Seleção da amostra

Considerando a necessidade de se incluir crianças portadoras de cárie severa da primeira infância, o Centro de Educação Infantil n.1 da Cidade Estrutural foi escolhido para seleção da amostra, obedecendo-se os seguintes critérios de inclusão: crianças terem entre 48 e 71 meses de idade, boas condições gerais de saúde, dentição decídua completa e comportamento colaborador que permitisse a realização dos exames e tratamento, conforme a necessidade desse último. Foram excluídas aquelas crianças que não apresentaram boa aceitação à realização dos procedimentos e/ou cujos pais não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A Cidade Estrutural é uma comunidade da região administrativa do Setor Complementar de Indústria e Abastecimento, no Distrito Federal, cuja formação deveu-

se a uma invasão de catadores de lixo próximo ao aterro sanitário de outras regiões administrativas. Apesar de ter sido contemplada em 2014 com melhorias na infraestrutura urbana, ainda compreende cidade de população com extremamente baixo poder sócio-cultural.

4.1.3 Exame físico intra-bucal

O exame físico intra-bucal foi realizado por uma única avaliadora, assistida por uma anotadora em ambiente escolar. Para tanto, a examinadora foi treinada e calibrada na utilização do critério Nyvad (anexo 3) (79,80), que foi utilizado para registro da cárie dentária (tabela 2).

Tabela 2. Critério Nyvad com seus códigos e descritores

CÓDIGO	CARACTERÍSTICA	DESCRIÇÃO
0*	Hígido	Esmalte com translucidez e textura normal (coloração em fissuras permitidas, desde que hígida)
1	Cárie ativa (Superfície intacta)	Superfície de esmalte branca ou amarelada com perda de brilho e rugosa ao toque com ponta da sonda; Superfície lisa: lesões de cárie típicas localizadas próximas à margem gengival. Fissura/fóssulas: morfologia intacta; lesão estendendo ao longo das paredes da fissura.
2	Cárie ativa (Superfície irregular)	Mesmo critério do código 1. Microcavidade restrita ao esmalte
3**	Cárie ativa (Cavitada)	Cavidade facilmente visível a olho nu em esmalte/dentina; superfície da cavidade amolecida a sondagem leve. Pode haver ou não envolvimento pulpar.
4	Cárie inativa (Superfície intacta)	Superfície do esmalte esbranquiçada, amarronzada ou negra. Esmalte pode estar brilhante, duro e liso ao suave toque da sonda através da superfície. Nenhuma perda detectável clinicamente de substância. Fissura/fóssula: morfologia intacta, lesão estendendo ao longo das paredes da fissura.
5	Cárie inativa (Superfície irregular)	Mesmo critério do código 4. Defeito superficial localizado (microcavidade) restrita ao esmalte
6	Cárie inativa (cavitada)	Cavidade facilmente visível a olho nu em esmalte/dentina; superfície da cavidade pode estar brilhante e dura a sondagem. Sem envolvimento pulpar.
7	Restauração (superfície hígida)	Restauração bem adaptada
8	Restauração + cárie ativa	Lesão de cárie pode estar cavitada ou não
9	Restauração + cárie inativa	Lesão de cárie pode estar cavitada ou não

*Código utilizado para seleção do G1; ** Código utilizado para seleção do G2

Para o treinamento, a examinadora participou de uma aula teórica sobre o critério Nyvad ministrada por uma especialista, na qual foram utilizadas fotografias de dentes hígidos e com lesões de cárie de diferentes níveis de acometimento. Os critérios utilizados para julgar se uma lesão é ativa ou não também foram discutidos.

Para a calibração, foram realizados exames visual tátil em 10 crianças de 5 anos de idade do Centro de Educação Infantil n.1 da Estrutural, aleatoriamente selecionadas, que não participaram da investigação, porém receberam tratamento

conforme repectivas necessidades detectadas. Os exames foram realizados em macas portáteis, em sala bem iluminada, por dois dias consecutivos. Foram utilizados sonda OMS, espelho clínico, rolete de algodão, sem a utilização da seringa tríplice. Todos os dados foram anotados por uma assistente, também treinada, em uma ficha específica (apêndice 3). Os exames foram repetidos num intervalo de uma semana, e a pesquisa só se iniciou após a examinadora atingir um coeficiente kappa de 0,82.

Para os estudo principal, foram examinadas 92 crianças, de acordo com a idade indicada pelos dados de matrícula das mesmas. Ao final dos exames, 41 crianças compuseram o grupo 1 (G1) (figuras 1a e 1b) e 41 o grupo 2 (G2) (figuras 1c e 1d), considerando a ausência de qualquer sinal de cárie (G1 - Nyvad código 0) ou a presença lesão de cárie ativa em dentina (G2 - Nyvad código 3), com ou sem ocorrência lesão de cárie em esmalte, com ou sem envolvimento pulpar.



Figura 1. (a) e (b): crianças do grupo 1 com ausência de qualquer sinal de cárie (G1 - Nyvad código 0); (c) e (d): crianças do grupo 2 com presença lesão de cárie ativa cavitada em dentina (G2 - Nyvad código 3)

4.1.4 Coleta de saliva

Todas as coletas de saliva foram realizadas na escola por uma única operadora, acompanhada por uma auxiliar entre 09:00 e 11:00 horas da manhã para minimizar o efeito do ritmo circadiano e 2 h após a última refeição (15). Um estudo piloto para treinamento da examinadora e anotadora foi realizado com base nos protocolos de coleta estimulada e não-estimulada realizados em estudos anteriores (5,12,15).

A última refeição das crianças foi o café da manhã balanceado, às 07:00 horas, realizado na escola. Em seguida, os participantes eram levados a uma sala para realizar escovação supervisionada utilizando-se pedra-pomes em pó e água (12) e aguardar pelos procedimentos de coleta. A saliva estimulada e não-estimulada das crianças de ambos os grupos foi coletada em dois dias consecutivos

A saliva não estimulada (UWS - *Unstimulated whole-saliva*) foi coletada com um catéter plástico macio descartável (figura 2a), que foi introduzido na cavidade bucal das crianças, após ser conectado a uma bomba de sucção elétrica portátil (Graco, California, USA) (figura 2b). Como o objetivo do método é a coleta de saliva não estimulada e a presença do catéter flexível pode fornecer uma ligeira estimulação, a saliva produzida nos primeiros 10 segundos foi descartada (31). O procedimento foi explicado para a criança antes e a mesma foi orientada para manter os olhos abertos, não mastigar e não movimentar a mandíbula para não estimular o fluxo salivar.

A coleta foi realizada em uma sala bem ventilada e bem iluminada com a criança sentada confortavelmente em uma cadeira. A assistente realizou a anotação das informações pessoais do participante e da coleta em ficha própria (apêndice 3). Usando luvas, a examinadora inseriu um sugador descartável conectado à uma bomba de aspiração à vácuo portátil e ligou o aparelho. Com auxílio de um cronômetro, a saliva foi coletada durante 2 minutos permitindo o cálculo do fluxo salivar inicial (32). Após este período, a coleta continuou até serem coletados 3,5 mL de saliva mensurada no tubo Falcon graduado.

O tempo de coleta da saliva foi cronometrado e registrado (5). O cálculo do fluxo foi feito dividindo o total de saliva obtido em mL dividido por 2. A amostra foi colocada

em tubo de ensaio identificado (nome, grupo e data) e foi mantida em gelo durante toda a coleta para posterior procedimento de adequação e armazenamento no laboratório (32). Todo o procedimento foi repetido no dia seguinte, na mesma sequência e hora, para todas as crianças com o objetivo de garantir a confiabilidade dos dados.

A coleta da saliva total estimulada (SWS – *Stimulated whole-saliva*) foi realizada por meio da mastigação de um pedaço de filme plástico (parafilme de 6.25 cm², Bemis NA, Neenah, WI, USA) que a criança foi orientada a mastigar enquanto se procedia a coleta da mesma (31). Um tubo de plástico (*Falcon Tube*) graduado foi utilizado para a coleta (figura 2c). A criança foi orientada a cuspir a saliva no tubo a cada minuto e não engolir (figura 2d). Todo o procedimento foi cronometrado e registrado em ficha própria por um assistente (apêndice 3). A saliva coletada nos primeiros 60 segundos foi descartada, segundo preconiza Siqueira, o tempo para a ativa secreção salivar após estímulo (31). A coleta foi realizada por mais 8 minutos. Ao final, a criança foi orientada a cuspir a saliva com o parafilme (44). Foi registrada a razão entre o volume de saliva coletada e o tempo utilizado na coleta (mL/min). Todas as amostras foram identificadas e mantidas no gelo para posterior procedimento em laboratório.



Figura 2. (a) e (b): coleta de saliva não-estimulada (UWS); (c) e (d): coleta de saliva estimulada (SWS)

4.1.5 Tratamento restaurador atraumático

As crianças do Grupo 2, portadoras de cárie severa da primeira infância foram tratadas por uma odontopediatra em ambiente escolar treinado para realização do tratamento em campo. As lesões de cárie cavitadas foram tratadas por meio do ART (16) e as lesões ativas em esmalte receberam fluoroterapia com verniz fluoretado

(*Colgate Duraphat Varnish, London, UK*). Crianças com lesões cavitadas em dentina com envolvimento pulpar receberam tratamento endodôntico (realizado na clínica de Odontopediatria do Hospital Universitário de Brasília) previamente ao TRA. Crianças com lesões de cárie extensas sem a possibilidade de receberem tratamento endodôntico ou raízes dentárias remanescentes tiveram tais elementos dentários extraídos na própria escola.

A fluoroterapia constitui da aplicação de verniz fluoretado (*Colgate Duraphat Varnish 50mg/MI Dental Suspension*) aplicado com *microbrush* nas lesões de mancha branca ativas em esmalte (figuras 3a e 3b). O procedimento foi realizado uma vez por semana durante quatro semanas consecutivas segundo o seguinte protocolo:

- a criança foi deitada na maca;
- os dentes foram limpos;
- foi realizada a secagem da superfície dentária com gaze;
- Verniz fluoretado Duraphat foi aplicado com auxílio de *microbrush*.

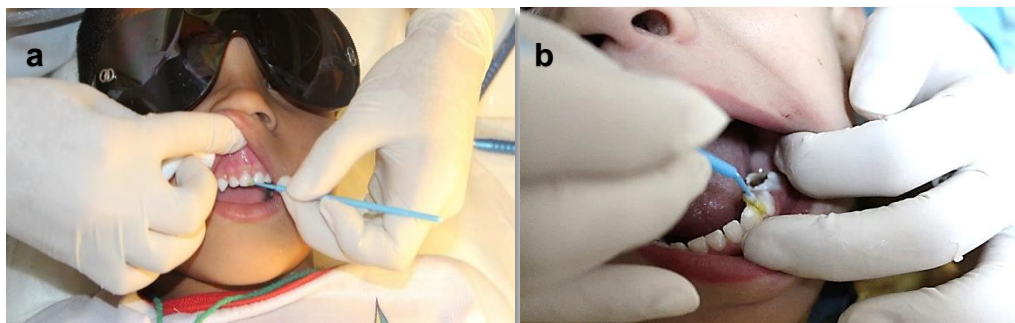


Figura 3. (a) e (b): aplicação de verniz fluoretado em lesões de mancha branca ativas em esmalte de crianças do G2

Para as lesões cavitadas em dentina, o TRA foi realizado na própria escola, utilizando-se macas portáteis, Kit ART (*Duflex - SSWhite, MG, BR*), sonda OMS, espelho clínico, gaze e rolete de algodão.

A figura 4 mostra lesão de cárie cavitada ativa em dentina (figura 4a) em uma criança do G2 e a restauração de TRA concluída (figura 4b). A sequência operatória foi realizada da seguinte maneira: após a colocação da criança na maca, os dentes foram limpos e o campo operatório isolado com roletes de algodão. Em seguida, foram utilizadas curetas afiadas para a remoção da dentina cariada. Caso houvesse esmalte sem suporte, este foi quebrado também manualmente. A remoção da dentina seguiu os preceitos da remoção seletiva de tecido de cariado (69). Tendo sido removido o tecido cariado amolecido, a cavidade foi restaurada utilizando-se cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade (*Equia Fil*, GC America, EUA) seguindo o protocolo abaixo:

- Lava-se e seca-se a cavidade com uma bolinha de algodão molhada com água e seca, respectivamente;

- Faz-se o condicionamento da cavidade utilizando-se uma bolinha de algodão embebida em ácido poliacrílico a 11,5% (*Nova DFL*, RJ, BR) por 15 segundos;

- Lava-se com uma bolinha de algodão embebida em água de 5 a 10 segundos e seca-se com bolinha de algodão;

- Manipula-se mecanicamente (Amalgamador Capsular digital EC-Mix-Ecel SP, BR) as cápsulas do *Equia Fil* (GC America, EUA) por 10 segundos;

- Imediatamente após, inserir o material colocando-se a ponta da seringa na parte inferior da cavidade e preenchendo-a para além de seus limites, até que o ionômero se estenda sobre as fissuras adjacentes;

- Pressiona-se o dedo enluvado e vaselinado sobre a cavidade por 40 segundos;

- Retira-se o excesso de ionômero de vidro com instrumentos de corte manual e um explorador na crista marginal;

- Verifica-se a oclusão utilizando-se papel carbono (*Contacto Film Angelus*, SP, BR);

- Aplica-se o protetor de superfície (*Equia Coat*, GC America) e fotopolimeriza-se (Fotopolimerizador Gnatus, SP, BR) por 20 segundos;

Nos casos de cavidades de classe II, utilizou-se o sistema de matriz de aço e grampo *Palodent* (Dentsply Sirona, PA, EUA) e cunha de madeira (cunha anatômica de Madeira – TDV, SC, BR).

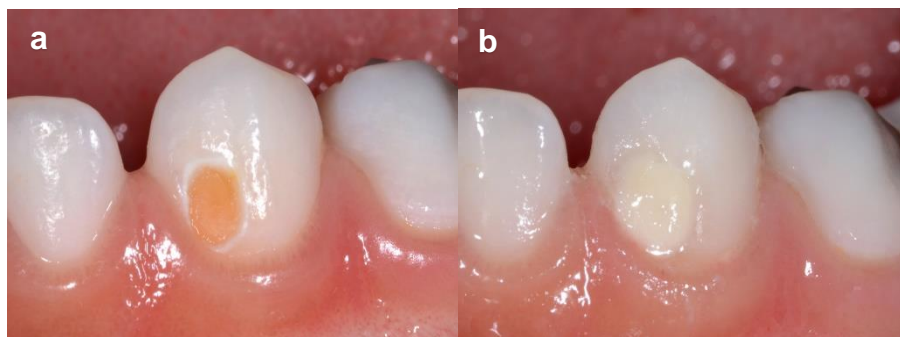


Figura 4. (a) lesão de cárie cavitada ativa em dentina no dente 73; (b) dente restaurado seguindo o protocolo TRA

4.1.6 Reavaliação do G2

Dois meses após a realização dos tratamentos, as crianças do G2 foram reexaminadas segundo o critério Nyvad pela mesma avaliadora. Nova coleta de saliva, estimulada e não estimulada, foi realizada em dois dias consecutivos, seguindo os protocolos já descritos. Desta forma, a avaliação do perfil salivar do G2 ocorreu em dois momentos, t0 e t1, ou seja, antes e após a intervenção terapêutica, respectivamente.

4.1.7 Procedimento para adequação e armazenamento das amostras

Todas as amostras foram identificadas e mantidas no gelo durante todo o procedimento de coleta. Imediatamente após o término da coleta em ambiente escolar, foram encaminhadas ao Laboratório do Departamento de Farmácia da Universidade de Brasília. No laboratório, todas as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g 4°C por 20 min (55) e o sobrenadante foi separado dos pellets em alíquotas de 1 mL. As amostras foram congeladas a - 20°C e, após a liofilização, foram congeladas, armazenadas a - 80° C (12) e exportadas em gelo seco para o Departamento de Bioquímica da *Schulich School of Medicine & Dentistry, University of Western Ontario (UWO), in London, ON, Canada*.

4.2 PARTE II: PROCEDIMENTOS REALIZADOS NO CANADÁ

4.2.1 Preparo das amostras para realização dos experimentos laboratoriais

As amostras exportadas para o Canadá foram submetidas a uma sequência de procedimentos no Laboratório de Saliva do Departamento de Bioquímica da *Schulich School of Medicine & Dentistry of UWO, London, ON, Canada*. Para as análises da saliva coletada, as amostras liofilizadas e reidratadas com 1 mL de água ultrapura e os tubos *Eppendorf* de 1,5 mL foram agitados por 30 segundos, num *Eppendorf Thermomixer F2.0 (IL, USA)* estando prontos para serem submetidos ao primeiro experimento laboratorial.

4.2.2 Experimento 1: Ensaio do ácido bicinconínico (*Bicinchoninic acid assay - BCA*)

A concentração significativa de proteínas presentes no sobrenadante da saliva (WSSs – *Whole-saliva supernatants*) foi medida por meio do Ensaio do Ácido Biocinconínico (BCA - *Thermo Fisher Pierce, Rockford, IL, USA*) utilizando-se albumina de soro bovino como padrão (*IL, USA*) (44,55). Para essa análise, nove soluções-padrão de albumina sérica em concentrações crescentes pré-estabelecidas de 0 a 2000 µg/mL foram adicionadas ao reagente do BCA em duplicata para se construir a curva de calibração ao lado das amostras de saliva a serem estudadas e colocadas para reagir por trinta minutos. A absorbância foi então medida por um espectrômetro específico (*iMark Microplate Reader, Bio Rad Inc., Hercules, USA*) e os dados encontrados foram exportados para o programa Microsoft Excel 2013 (*Microsoft Inc., Redmond, USA*). Nele, foi construída uma curva de calibração feita com as médias dos valores de absorbância de cada uma das concentrações de soluções-padrão, na qual foram extraídos o coeficiente de determinação R^2 e a equação de primeiro grau correspondente. O critério adotado para a validação da análise foi encontrar o valor do coeficiente de determinação R^2 dessa curva de calibração acima de 0,99 e a equação do primeiro grau foi utilizada para se calcular a concentração de proteínas de cada amostra. Os dados da concentração de proteínas totais foram analisados estatisticamente pela análise de variância.

Os resultados obtidos foram registrados para realização de cálculos necessários para posterior avaliação. Alíquotas contendo 20 µg de proteínas salivares foram preparadas em novos microtubos *Eppendorf* de 1,5 mL e desidratados em vapor rotativo (*Vacufuge Plus, Eppendorf, Hamburg, Germany*), sendo mantidas a – 20° C até o uso no experimento seguinte.

4.2.3 Experimento 2: SDS-PAGE (*Sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) – Gel de Eletroforese

Esse experimento foi realizado para determinação da quantidade de proteínas salivares de acordo com seus pesos moleculares por meio da separação eletroforética. Após a medição das concentrações de proteínas totais nas amostras, foram calculadas as médias e desvios padrão de concentração de proteínas totais nas amostras do G1, G2-t0 e G2-t1. Para cada grupo citado, foram selecionadas 6 amostras coletadas de forma estimulada e de forma não-estimulada com valores de concentração de proteínas próximos às médias totais dos grupos.

Cada alíquota selecionada foi ressuspensa com 20 µL de uma solução-tampão composta por dodecil sulfato de sódio (SDS) a 2%, ditioneitol (DTT) a 165 mM, glicerol a 20%, tris (hidroximetil) aminometano a 20 mM ajustado a pH 6,8 com ácido hidrocloreídrico (Tris-Cl), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 2 mM, azul de bromofenol a 0,1 mg/mL e 5 mM de beta-mercaptoetanol (BME). Em seguida, ressuspensões foram fervidas por 5 minutos.

Cada ressuspensão foi carregada em um poço de um gel de poliacrilamida a 12% (gel de separação) e a 4% (gel de carregamento), contendo dodecil-fosfato de sódio, montado em um conjunto minigel de eletroforese *Mini Protean (Bio-Rad Inc., Hercules, USA)*. 5 µL de *Precision Plus All Blue (Bio-Rad Inc., Hercules, USA)* foi carregado no primeiro poço de cada gel para servir de padrão de referência. O processo de eletroforese seguiu o método de Laemmli (53), tendo como parâmetros temperatura ambiente de 22° C e corrente de 100 V por cerca de duas horas. A corrente foi desligada quando as proteínas alcançaram aproximadamente 0,5 cm da parte inferior do gel. As placas de vidro do minigel foram separadas e o gel nela contido foi retirado e corado a temperatura ambiente por cerca de duas horas com Azul de Coomassie G250 a 0,2%,

metanol a 40% e ácido acético a 10%. A etapa de descoloração foi realizada com solução aquosa de metanol a 40% e ácido acético a 10% por aproximadamente 16 horas até que o gel estivesse suficientemente descolorido, sendo em seguida, submerso em água ultrapura.

4.2.4 Experimento 3: Gel nativo catiônico

A partir do experimento 1 (parte II) do presente estudo, foram selecionadas amostras do G1, G2-t0 e G2-t1, coletados de forma estimulada e não estimulada, com concentrações de proteínas totais próximos das médias totais de cada respectivo grupo para submetê-las ao gel nativo catiônico.

Esse método eletroforético utiliza um gel específico, preparado em duas fases: o gel de separação e o gel de carregamento, cada um contendo concentrações diferentes de poliacrilamida e polimerizadas por luz incandescente de 120 V, a 100 e 60 W, respectivamente. Os géis foram montados no conjunto minigel de eletroforese *Mini Protean (Bio-Rad Inc., Hercules, USA)*, carregados com as proteínas salivares ressuspensas em 20 µL de uma solução tampão aquosa contendo 4 g de sacarose, 4 mg verde metil e volume final de 10 mL. Sendo um método nativo, as proteínas ressuspensas não são fervidas, sendo carregadas no gel de eletroforese após a ressuspensão. A ressuspensão de 4 µg de cada uma das histatinas 1, 3 e 5 foi realizada em 20 µL da solução-tampão utilizada, para servir como padrão de comparação. A eletroforese foi montada para que as proteínas catiônicas fossem atraídas do anodo localizado na parte superior para o catodo localizado na parte inferior do gel, utilizando voltagem de 100 V por um tempo de aproximadamente 2,5 horas. As amostras ressuspensas foram carregadas nos géis em poços contíguos. Cada amostra de saliva foi submetida a três experimentos independentes de eletroforeses e cada grupo foi disposto em um único gel.

A corrente elétrica foi interrompida quando as proteínas alcançaram 0,5 cm de distância do fim da parte inferior do gel. As placas de vidro do minigel foram separadas e o gel foi fixado por 30 min com ácido tricloroacético a 20%, corado por uma hora em solução aquosa específica para gel catiônico, contendo Azul de Coomassie G250 a 0,1%, metanol a 8% e ácido acético a 7% em temperatura constante de 60°C. Em

seguida, os géis foram descoloridos com metanol, ácido acético e água na proporção 40:10:50 até que as imagens ficassem nítidas. Os géis foram conservados em água ultrapura até que a realização do registro das imagens fosse realizada no programa *Bio-Rad ChemiDrop MP* para posteriores análises.

4.2.5 Imagens: Bio-Rad Image Lab

As imagens do gel foram obtidas utilizando-se um digitalizador *Bio-Rad ChemiDrop MP* (*Bio-Rad Inc., Hercules, USA*), conectado a um computador contendo um programa *Image Lab 5.2* (*Bio-Rad Inc., Hercules, USA*), sendo então, exportadas para o formato *JPEG*. As linhas e bandas estudadas foram selecionadas com as ferramentas contidas no referido programa e as bandas mais intensas foram selecionadas para quantificação densitométrica relativa, usando valores de intensidade de cada banda ajustada pelos valores do plano de fundo.

4.2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o *software IBM SPSS Statistic* versão 20.0 (*IBM Corp., Armonk, NY, USA*). Após a aplicação do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, foi verificado que os dados de fluxo salivar e concentração de proteínas não apresentaram distribuição normal. Sendo assim, determinou-se o uso do teste *t* de *Student* para amostras independentes para analisar os pesos moleculares. Para comparar fluxos salivares e concentração de proteínas totais, testes estatísticos não-paramétricos foram empregados. Para a avaliação intergrupo, G1 vs G2, aplicou-se o teste de Mann-Whitney e para avaliação intragrupo, G2-t0 vs G2-t1, empregou-se o teste de Wilcoxon. Em todas as análises, o nível de significância foi fixado em 5% ($p < 0,05$) (81,82).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

Foram incluídas 82 crianças, das quais 46 eram do sexo masculino (56,1%) e 36 do sexo feminino (43,9%), com média de idade de 61,9 meses ($\pm 2,08$). A média de idade das crianças do G1 foi 62,86 meses ($\pm 5,91$) e G2 foi de 61 meses ($\pm 6,70$) ($p = 0,562$).

5.2 PERFIL DE CÁRIE DENTÁRIA

A distribuição dos códigos Nyvad (80) das crianças do G2 está apresentada na tabela 3. Observa-se que o código mais prevalente foi o 3 e que o escore médio foi de 11,68 superfícies ativas e inativas em esmalte e/ou dentina.

Tabela 3. Distribuição dos códigos Nyvad de cárie em crianças do G2

Critério Nyvad	Frequência de superfícies afetadas (DP)
Código 1 - Cárie ativa (superfície intacta)	4,24 ($\pm 1,48$)
Código 2 - Cárie ativa (superfície descontínua)	4,14 ($\pm 1,04$)
Código 3 - Cárie ativa (superfície cavitada)	6,84 ($\pm 1,32$)
Código 4 - Cárie inativa (superfície intacta)	0,42 ($\pm 0,62$)
Código 5 - Cárie inativa (superfície descontínua)	0,66 ($\pm 0,36$)
Código 6 - Cárie inativa (superfície cavitada)	4,84 ($\pm 1,29$)
Código 7 - Superfície restaurada (bem adaptada)	4,72 ($\pm 1,15$)
Código 8 - Superfície restaurada com presença de cárie ativa na interface dente-restauração	5,88 ($\pm 1,44$)
Código 9 - Superfície restaurada com presença de cárie inativa na interface dente-restauração	4,66 ($\pm 0,82$)

[†]DP = Desvio padrão

5.3 FLUXO SALIVAR

Os valores médios e medianas das taxas de fluxo salivar estão apresentados na tabela 4. Nota-se que, tanto para o UWS quanto para o SWS, os valores médios diferiram estatisticamente entre G1 e G2-t0 e G2-t0 e G2-t1 (ambos $p < 0,001$). Além disso, no G2-t0, 7 (17,07%) e 22 (53,65%) crianças apresentaram taxas de fluxo de SWS ($< 0,6$ mL / min) e UWS ($< 0,2$ mL / min) extremamente baixas, respectivamente. O número de crianças (G2-t1) que continuaram apresentando valores extremamente baixos para SWS foi reduzido para 2 (4,88%) e para UWS para 9 (21,95%) crianças após o tratamento odontológico.

Tabela 4. Taxas de fluxo salivar para a saliva total estimulada e não-estimulada de G1, G2-t0 e G2-t1

	G1	G2-t0	G2-t1
	n = 41	n = 41	n = 41
Fluxo salivar estimulado (mL/min)			
Mediana (IIQ)	1,38 (1,17-2,32)	1,05 (0,76-1,23)	1,31 (1,04-2,19)
Comparação (valor de p)	G1 vs G2-t0 ($< 0,001$)	G2-t0 vs G2-t1 ($< 0,001$)	G2-t1 vs G1 (0,428)
Fluxo $< 0,6$ mL/min	0	7 (17,07%)	2 (4,88%)
Fluxo salivar não-estimulado (mL/min)			
Mediana (IIQ)	0,50 (0,43-0,60)	0,29 (0,12-0,45)	0,50 (0,41-0,60)
Comparação (valor de p)	G1 vs G2-t0 ($< 0,001$)	G2-t0 vs G2-t1 ($< 0,001$)	G2-t1 vs G1 (0,878)
Fluxo $< 0,2$ mL/min	0	22 (53,65%)	9 (21,95%)

Nota-se: DP = Desvio padrão; IIQ (Intervalo interquartil) = diferença entre os percentis 75 e 25

5.4 PERFIL PROTEICO

A figura 5 mostra os gráficos representativos do experimento 1 deste estudo, o Ensaio do Ácido Bicinconínico (BCA - *Thermo Fisher Pierce, Rockford, IL, USA*) utilizando albumina de soro bovino como padrão (*IL, USA*), para caracterização inicial das amostras de saliva coletadas.

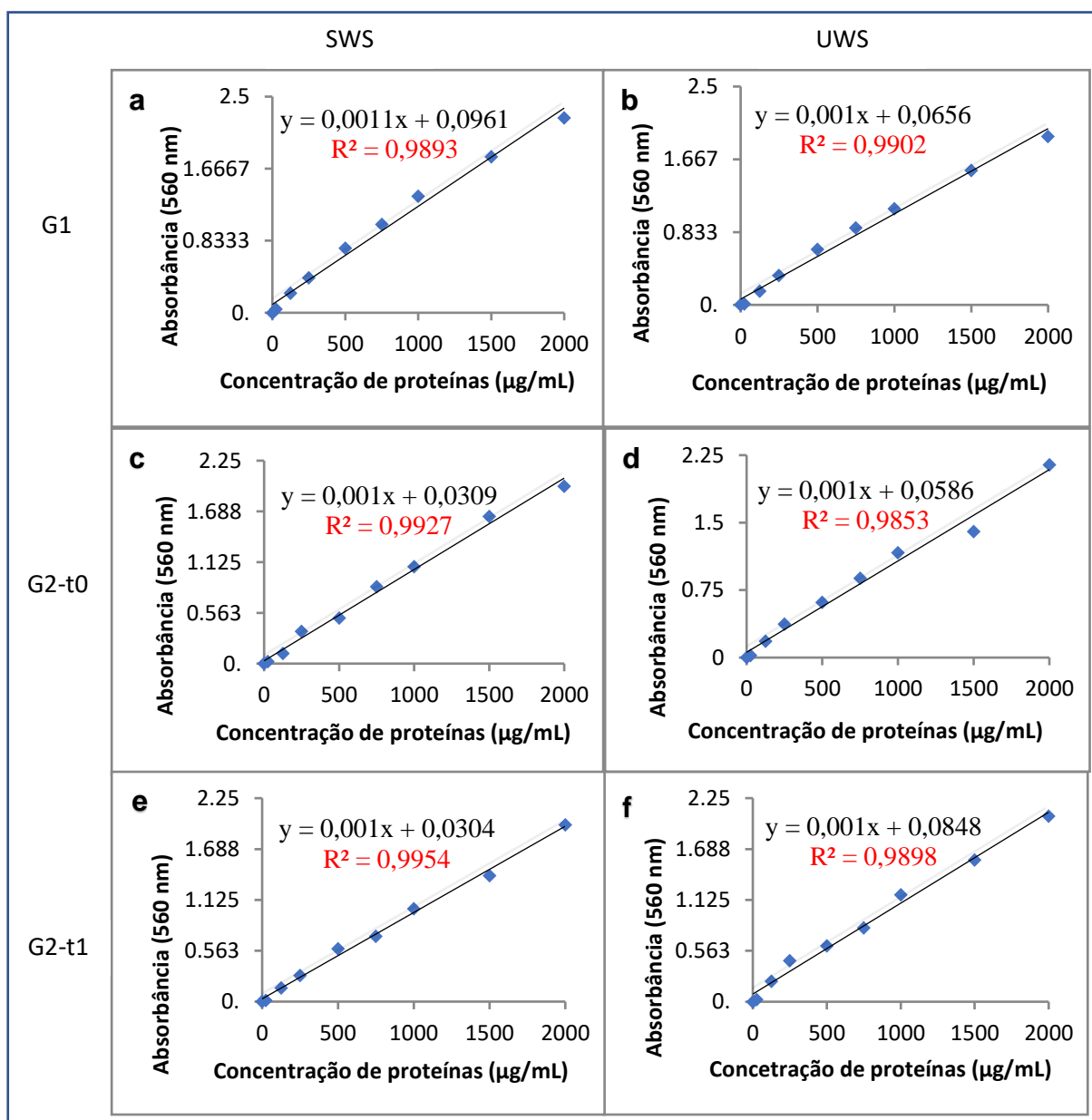


Figura 5. Concentração de proteína total das soluções-padrão em razão da absorbância diante dos padrões de albumina sérica bovina mostrando o desenvolvimento dos

resultados das amostras de G1 nas coletas estimulada (a) e não-estimulada (b), G2-t0 nas coletas estimulada (c) e não-estimulada (d) e G2-t1 nas coletas estimulada (e) e não-estimulada (f)

Os gráficos a, b, c, d, e e f (figura 5) mostram a calibração da curva dos padrões de albumina sérica utilizadas para o cálculo das concentrações de proteínas das amostras de saliva dos participantes do estudo. O valor do coeficiente de determinação R^2 encontrado foi 0,99, indicando alta correlação linear dos padrões de albumina sérica.

Todos os valores de concentrações de proteínas das amostra foram transferidos para um banco de dados e submetidos à análise estatística. Na tabela 5 observa-se que não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre G1 e G2-t1. No entanto, quando G2-t0 foi comparado aos outros grupos, diferenças estatísticas foram detectadas tanto em relação ao G1 ($p < 0,001$) quanto ao G2-t1 ($p < 0,001$), em ambas coletas estimulada e não-estimulada.

Tabela 5. Concentração de proteínas observada na SWS (*Stimulated whole-saliva*) e UWS (*Unstimulated whole-saliva*) em G1, G2-t0 e G2-t1

Variáveis	G1 n = 41	G2-t0 n = 41	G2-t1 n = 41
Concentração de proteínas (SWS) µg/mL			
Média (DP)	683,56 (240,63) ^A	1102,86 (252,37) ^B	657,21 (188,44) ^A
Mediana (IIQ)	637,30 (554,55-756,15)	1138,10 (879,35-1281,60)	632,20 (545,60-742,35)
Comparação (valor de p)	G1 vs G2-t0 (< 0,001)	G2-t0 vs G2-t1 (< 0,001)	G1 vs G2-t1 (0,749)
Concentração de proteínas (UWS) µg/mL			
Média (DP)	703,24 (196,06) ^A	1139,77 (422,69) ^B	723,22 (181,87) ^A
Mediana (IIQ)	663,90 (589,15-774,65)	1028,70 (845,95-1318,95)	712,40 (600,85-806,40)
Comparação (valor de p)	G1 vs G2-t0 (< 0,001)	G2-t0 vs G2-t1 (< 0,001)	G1 vs G2-t1 (0,368)

Nota-se: DP = Desvio padrão; IIQ (Intervalo interquartil) = diferença entre os percentis 75 e 25

* Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas

Com relação aos pesos moleculares das proteínas, as imagens dos géis de G1 e G2-t1 apresentaram distribuição de peso molecular semelhante, que diferiu do gel de G2-t0 (figura 6A). Na figura 6B, observa-se que G1 apresentou os maiores picos de densidade (> 1500) na faixa de intervalo de baixo peso molecular (a). A faixa intervalar de alto peso molecular (h) apresentou picos de baixa densidade em todos os grupos (<750).

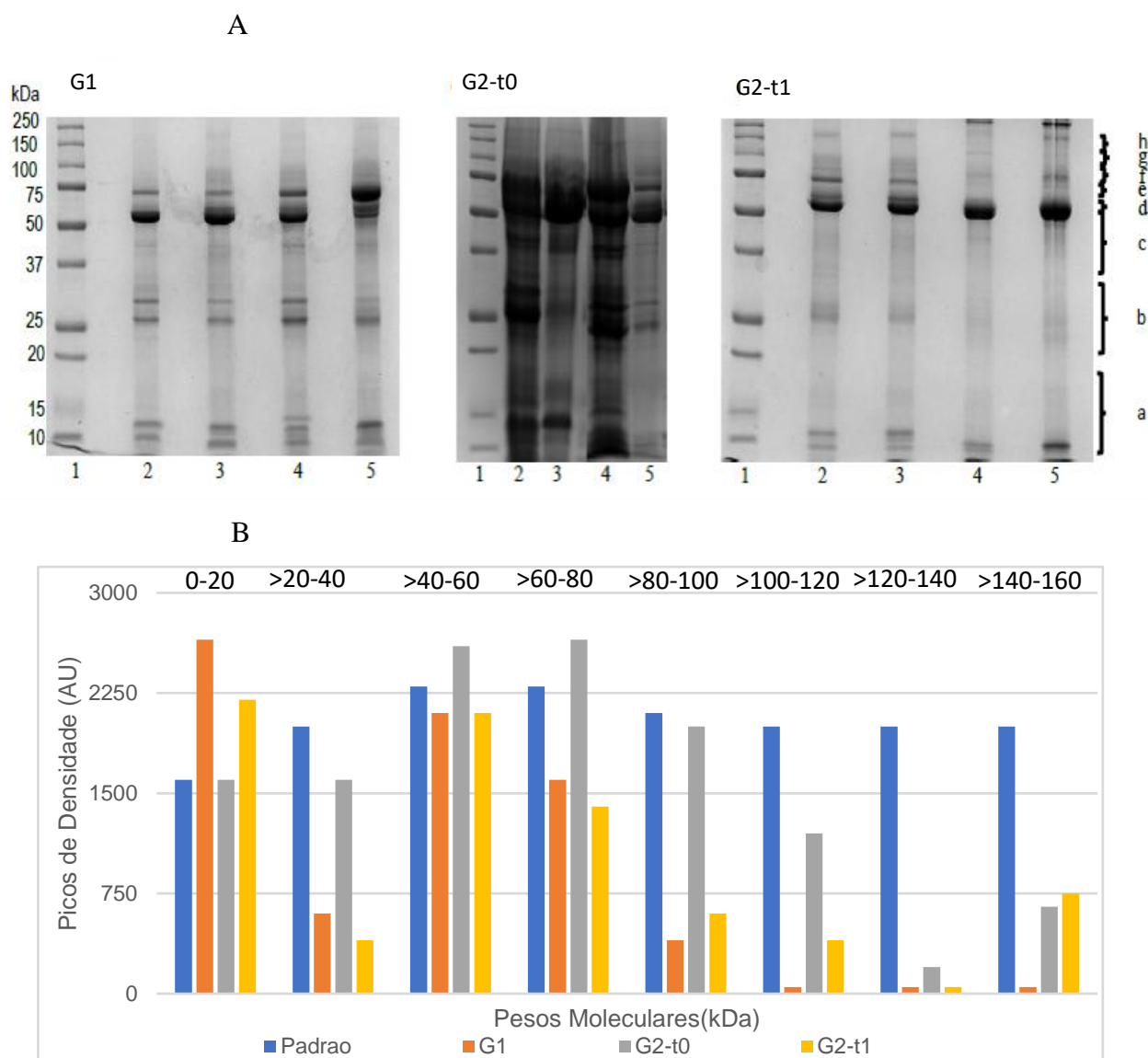


Figura 6 (A) gel SDS-PAGE de G1, G2-t0 e G2-t1. Na faixa 1: padrão de albumina com pesos moleculares pré-determinados (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 e 250 kDa). Da faixa 2 a 5: quatro alíquotas com 20 μ g de proteínas foram selecionadas de cada grupo. Os pesos moleculares foram expressos em kDa em intervalos variando até 250 (a: 0 a 20; b: > 20 a 40; c: > 40 a 60; d: > 60 a 80; e: > 80 a 100; f: > 100 para 120; g: > 120 a 140; e h: > 140 a 160 kDa). (B) Medidas de densidade óptica das pistas de gel SDS-PAGE mostrando os picos de densidade em relação aos pesos moleculares do padrão de albumina

Tabela 6. Pesos moleculares (PM) das proteínas detectadas no G1, G2-t0 e G2-t1 em intervalos pré-estabelecidos de 20 kDa

Intervalo	PM (kDa)	G1	G2-t0	G2-t1	P		
		n = 41	n = 41		G1 vs G2-t1	G1 vs G2-t0	G2-t0 vs G2-t1
		(%)	(%)	(%)			
A	0 – 20	39,76	20,65	24,56	0,089	0,012	0,038
B	>20-40	12,37	19,89	10,92	0,098	0,023	0,026
C	>40-60	22,42	38,22	22,73	0,654	0,042	0,04
D	>60-80	20,72	39,83	18,14	0,435	0,005	0,003
E	>80-100	12,17	26,07	13,43	0,563	0,002	0,006
F	>100-120	2,19	17,85	10,28	0,043	0,026	0,022
G	>120-140	3,21	8,62	2,45	0,786	0,031	0,012
H	>140-160	3,82	13,98	14,11	0,039	0,045	0,068

Quando a distribuição dos pesos moleculares das proteínas G1 e G2-t0 foi comparada, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre todos os intervalos (tabela 6). A comparação entre G1 e G2-t1 mostrou que não houve diferença estatística significativa, exceto para os intervalos f (> 100 a 120 kDa) e h (> 140 a 160 kDa). Pode-se especular tais diferenças com a vulnerabilidade à recorrência da doença. A comparação entre G2-t0 com G1 e G2-t1 mostrou que houve diferenças estatísticas significativas em todos os intervalos de Pesos Moleculares.

As imagens obtidas pelo gel catiônico nativo são mostradas na figura 7. A histatina intacta foi detectada em todos os grupos, porém foi mais frequentemente observada no G1 (figura 7).

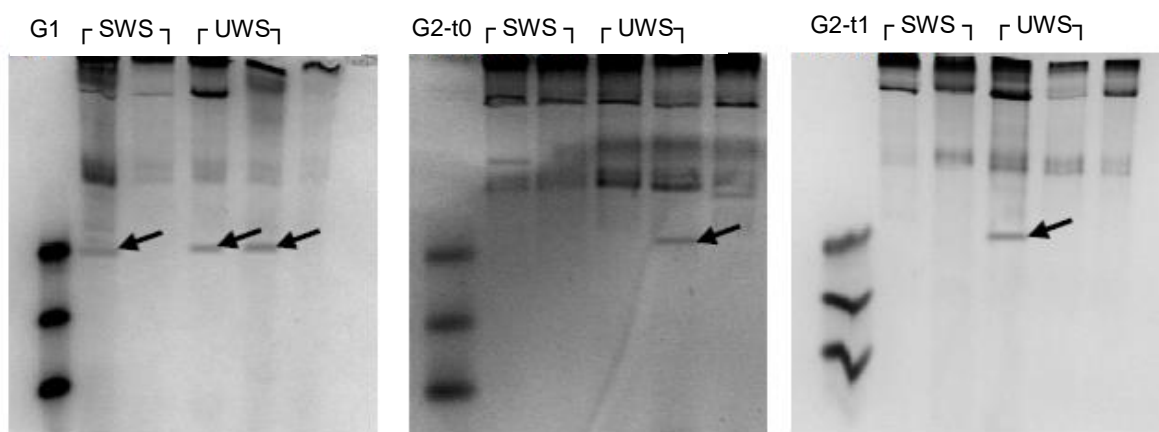


Figura 7 Imagem de eletroforese em gel catiônico corado com azul de Coomassie. Na coluna da esquerda estão os padrões de histatina 1, 3 e 5 corados. Nas outras colunas são amostras de G1, G2-t0 e G2-t1, sendo as faixas 2 e 3 amostras SWS, 4 e 5 amostras UWS e faixas 6 com amostras escolhidas aleatoriamente. As setas mostram bandas coradas em regiões correspondentes à histatina

6 DISCUSSÃO

A presente investigação forneceu informações sobre o perfil proteico salivar de crianças com e sem experiência de cárie dentária. Os achados mais importantes observados foram que a presença de lesões de cárie cavitadas em dentina não tratadas afeta algumas características importantes da saliva e seu perfil salivar, e que tais alterações podem ser minimizadas por meio de tratamento odontológico.

Embora a cárie dentária seja o foco principal de estudos ao longo de várias décadas por meio de diferentes metodologias, a doença ainda é o um grave problema de saúde bucal tanto em crianças como em adultos (83). Para a população infantil, em especial, a cárie é a doença crônica de maior prevalência em todo o mundo (2), tornando-a um sério problema de saúde pública, cujo manejo clínico é extremamente dispendioso quando em estágios mais avançados (16). Além disso, a cárie severa da primeira infância pode ter um impacto negativo na qualidade de vida (84) e no crescimento da criança (6). Desta forma, faz-se necessário buscar alternativas que possam identificar indivíduos que sejam mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença, ou ao menos, métodos que sejam capazes de identificá-la o mais precocemente possível. Foi com base nesses argumentos que a presente investigação foi delineada.

Com relação à definição da ECC, a AAPD afirma que a doença é caracterizada pela presença de qualquer lesão cariosa (cavitada ou não) em crianças com até 71 meses de idade (68). No entanto, pode ser mais agressiva (s-ECC) quando dependendo do número de superfícies dentárias afetadas. Assim, 41 dos 82 participantes da presente investigação eram portadores de s-ECC, com um escore médio de 11,68 superfícies cavitadas e não-cavitadas (ativas e inativas). Além disso, é importante ressaltar que para evitar qualquer viés no diagnóstico da cárie dentária, optou-se por utilizar o critério de Nyvad, uma vez que este é capaz de detectar tanto a presença quanto à atividade da lesão cariosa, desde seu primeiro sinal clínico. Desta forma, pode-se inferir que o grupo controle do presente estudo foi composto por 41 crianças livres de cárie, já que foram incluídas apenas aquelas com código Nyvad 0. Por conseguinte, foram formados dois grupos claramente distintos em termos de perfil de cárie dentária com estilos de vida extremamente semelhantes. Para tal, foram observadas, durante a seleção dos

participantes, características que pudessem tornar os participantes homogêneos para reduzir variáveis confundidoras (63), tais como: endereço de moradia para garantir a mesma quantidade de ingestão de água fluoretada, o uso de medicamentos, doenças sistêmicas e rotinas de alimentação e higiene bucal, que somente pode ser controlada no período da manhã.

Outro ponto que merece discussão é o papel da saliva no desenvolvimento da cárie dentária. A literatura mostra que até a presente data, nenhum parâmetro salivar avaliado por um único teste, pôde distinguir com alta sensibilidade e especificidade indivíduos que, em condições normais, são propensos a desenvolver lesões cáries daqueles que não são (85,86).

Com relação ao fluxo salivar, a presente investigação identificou, no grupo de crianças com s-ECC antes de receberem tratamento, uma redução de 12,19% para as taxas de fluxo estimuladas e 31,7% para as taxas de fluxo não-estimuladas após receberem tratamento. Outras diferenças apresentadas pelo grupo com s-ECC antes de receberem tratamento foram os valores de concentração de proteínas e distribuição de pesos moleculares quando comparadas às crianças livres de cárie. Esse resultado discorda do estudo realizado em pré-escolares indianos, em que ambos os parâmetros não diferiram naqueles com ou sem s-ECC (77). Uma possível explicação pode estar relacionada ao critério diagnóstico de cárie utilizado. No presente estudo, como mencionado anteriormente, foi utilizado um critério mais acurado que permite a detecção de lesões em estágio inicial (79), enquanto que no estudo indiano, o índice CPO (cariado, perdido e obturado) foi aplicado. Neste sistema, apenas as lesões de cárie dentária cavitadas em dentina são incluídas, o que pode ter levado os pesquisadores a classificarem crianças com lesões de cárie em esmalte (em estágio inicial) como crianças livres de cárie.

O mesmo raciocínio pode ser aplicado a um estudo no qual não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a concentração de proteínas salivares em crianças alemãs diagnosticadas com e sem ECC (62). Os autores enfatizaram que as crianças que compuseram o grupo com ECC já apresentavam manifestação clínica da doença. Assim, este ponto metodológico pode ter introduzido um viés no que diz respeito ao diagnóstico da doença. Portanto, recomenda-se enfaticamente que, em estudos

futuros, crianças com lesões iniciais de cárie ativa em esmalte sejam consideradas doentes, uma vez que tais lesões, por definição, são contabilizadas tanto no diagnóstico de s-ECC quanto o de ECC (68).

Em relação ao tratamento odontológico oferecido às crianças do G2, pode-se afirmar que é uma estratégia amplamente testada no mundo, tais com Brasil (87,88), Holanda (89), China (90), Austrália (91), África do Sul (92), dentre outros países, enriquecendo a evidência científica relacionada à técnica. Apresenta como vantagem sua facilidade de uso em campo, o que aumenta o acesso da população aos cuidados de saúde bucal (69,70). Finalmente, o TRA tem se mostrado como uma forma mais “amigável” de introduzir a criança ao tratamento odontológico, uma vez que a anestesia local é raramente requerida e que não se usa o motor de alta rotação (71).

O gel de eletroforese SDS-PAGE foi utilizado para a análise do peso molecular das proteínas de crianças livres de cárie e daquelas com s-ECC antes e após receberem tratamento. As imagens dos géis dos grupos analisados mostraram que a presença de s-ECC influenciou na frequência de proteínas salivares e que o G1 apresentou perfil protéico rico em proteínas de baixo peso molecular. Esse não é um resultado inesperado, pois estudos anteriores mostraram que existe uma diferença entre o perfil de algumas proteínas salivares quando crianças afetadas pela ECC são comparadas a crianças não-doentes (74,93), indicando que elas têm o potencial de ser consideradas como biomarcadores para a ECC (94).

Sobre as proteínas salivares de baixo peso molecular, a evidência científica mostra que são proteínas precursoras da AEP e que exibem características hidrofóbicas (10), o que lhes confere alta afinidade pela hidroxiapatita. Adicionalmente, apresentam atividade antimicrobiana, de regeneração tecidual, de resposta imunológica e de biomineralização (24). Em estudos anteriores comparando crianças portadoras de s-ECC pré e pós-tratamento (75,95), a histatina-1 e a histatina-5 foram relatadas como possíveis biomarcadores para a s-ECC. Esses achados corroboram com os achados da presente investigação, em que a histatina foi mais frequentemente detectada no grupo de crianças livres de cárie e pode ser explicada pelo fato de a histatina ser considerada um dos principais componentes da estrutura protéica da superfície dentária (95). Além disso, tem sido demonstrado que a histatina inibe enzimas proteolíticas originadas de

microrganismos ou do hospedeiro, sendo considerada de grande importância no processo de defesa oral e reabilitação tecidual (97).

No que se refere ao impacto do tratamento odontológico realizado no grupo com s-ECC sobre os parâmetros salivares testados, observou-se que após o tratamento as diferenças encontradas entre o referido grupo antes de receber atendimento e o grupo de crianças livres de cárie não foram mais evidenciadas. Conforme descrito em estudos anteriores, tanto a expressão de diferentes peptídeos (95) quanto a atividade de proteínas salivares (75) sofrem alterações significativas quando grupos de crianças com s-ECC foram comparadas antes e após a realização de tratamento odontológico. Especula-se que a selagem de lesões cáries cavitadas pode modificar o perfil proteico da saliva e que a ativação de determinadas enzimas tem a capacidade de modular a colonização bacteriana (96), invertendo a direção das reações de catálise, provocando uma redução da acidez do meio bucal (75). O retorno ao padrão de concentração e distribuição de proteínas do grupo s-ECC após o tratamento para o padrão observado nos grupos livres de cárie também pode estar relacionado ao processo de regulação negativa de peptídeos antimicrobianos demonstrado em um estudo chinês (97) que utilizou peptídeos salivares para diferenciar o estado da cárie dentária correlacionando-a com a recorrência da s-ECC em pré-escolares. Observa-se que as diferenças encontradas entre os intervalos de altos pesos moleculares quando os grupos avaliados foram comparados mostraram-se próximos de valores não-significativos. Pode-se especular que, conforme encontrado no estudo chinês tais pesos moleculares podem estar associados à vulnerabilidade de reincidência da doença.

Com relação à metodologia aplicada nesta investigação, o método de separação eletroforética utilizando o SDS-PAGE pode ser considerado uma limitação do presente estudo. Embora seja bastante utilizado em muitos outros estudos (32, 98,99), o experimento tem sido relatado como procedimento que pode não ser sensível o suficiente para detectar diferenças sutis entre proteínas menos abundantes. Portanto, a combinação de métodos proteômicos seria aconselhável para garantir mais detalhamento e maior especificidade dos resultados.

7 CONCLUSÕES

7.1 CONCLUSÕES GERAIS

Foi observada diferença significativa no fluxo salivar e nos perfis proteicos da saliva estimulada e não-estimulada de crianças livres de cárie e com a presença de s-ECC, antes de receberem tratamento odontológico.

7.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

1. As diferenças encontradas entre concentrações de proteínas, fluxos salivares e pesos moleculares da saliva estimulada e não-estimulada de crianças livres de cárie e com a presença de s-ECC, antes de receberem tratamento odontológico foram minimizadas após a realização do tratamento odontológico.
2. Crianças livres de cárie apresentaram altos picos de densidade de moléculas com baixo peso molecular e maior presença de histatina intacta.
3. Crianças livres de cárie não apresentaram picos de densidade de moléculas com alto peso molecular.
4. A presença de picos de densidade de moléculas com alto peso molecular em crianças com s-ECC após receberem tratamento odontológico pode estar associada à recorrência da doença.

REFERÊNCIAS

1. Peltzer K, Mongkolkeha A. Severe early childhood caries and social determinants in three-year-old children from Northern Thailand: a birth cohort study. *BMC Oral Health* 2015; 15: 108.
2. Hajishengallis E, Parsaei Y, Klein MI, Koo H. Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. *Mol Oral Microbiol* 2015; Dec 30.
3. Paes Leme Azevedo TD, Ana Cristina Barreto Bezerra AC. Feeding Habits and Severe Early Childhood Caries in Brazilian Preschool Children. *Pediatr Dent*. 2005; 27: 28-33.
4. Zhang X, Yang S, Liao Z, Xu L, Li C, Zeng H et al. Prevalence and care index of Early childhood caries in mainland China: evidence from epidemiological surveys during 1987–2013. *Sci Rep*. 2016; Jan 13; 6:18897.
5. Jayaraj, D and Ganesan, S. Salivary pH and Buffering Capacity as Risk Markers for Early Childhood Caries: A Clinical Study. *Int J Clin Pediatr Dent* 2015; 8(3): 167-171.
6. Paes Leme AF, Koo H., Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res* 2006; 85: 878-887.
7. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res* 2011; 90: 294-303.
8. Siqueira WL, Helmerhorst EJ, Zhang W, Salih E, Oppenheim FG. Acquired Enamel Pellicle and Its Potential Role in Oral Diagnosis. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1098:504-9.
9. Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG. Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. *J Proteome Res*. 2007 Jun; 6(6): 2152-60.
10. Zimmerman JN, Custodio W, Hatibovic-Kofman S, Lee YH, Xiao Y and Siqueira WL. Proteome and Peptidome of Human Acquired Enamel Pellicle on Deciduous Teeth. *Int J Mol Sci* 2013; Jan 14(1): 920-934.
11. Marcenes W, Kassebaum NJ, Barnabé E, Flexman A, Naghavi M, Lopez A, Murray CJL. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res* 2013; 92:592.

12. Lee YH, Zimmerman JN, Custodio W, Xiao Y, Basiri T, Hatibovic-Kofman S, Siqueira WL. Proteomic Evaluation of Acquired Enamel Pellicle during In Vivo Formation. *PLoS One* 2013; Jul 3; 8(7): e67919.
13. Lihong Guo L, Shi W. Salivary Biomarkers for Caries Risk Assessment. *J Calif Dent Assoc* 2013 Feb; 41(2): 107–118.
14. Vukosavljevic D, Custodio W, Siqueira WL. Salivary proteins as predictors and controls for oral health. *J Cell Commun Signal* 2011; 5: 271-275.
15. Siqueira WL, Bakkal M, Xiao Y, Sutton JN, Mendes FM. Quantitative Proteomic Analysis of Gingival Crevicular Fluid in Different Periodontal Conditions. *PLoS One* 2013; Oct 1; 8(10): e75898.
16. Leal SC, Bronkhorst EM, Fan M, Frencken JE. Effect of different protocols for treating cavities in primary molars on the quality of life of children in Brazil-1 year follow-up. *Int Dent J* 2013 Dec; 63(6): 329-35.
17. Medeiros PBV, Otero SMA, Frencken JE, Bronkhorst EM, Leal SC. Effectiveness of an oral health program for mothers and their infants. *International Journal of Paediatric Dentistry* 2014; Jan 7: 1-6.
18. Slade GD, Bailie RS, Roberts-Thomson K, Leach AJ, Raye I, Endean C, Simmons B, Morris P. Effect of health promotion and fluoride varnish on dental caries among Australian Aboriginal children: results from a community-randomized controlled trial. *Community Dent Oral Epidemiol* 2011; 39: 29–43.
19. Paige CJ, Shahid SK. Developing and implementing a fluoride varnish programme for young children in Bradford, UK. *Community Dent Health* 2014; Mar 31(1):5-8.
20. Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE. New insights into the composition and Functions of the Acquired Enamel Pellicle. *J Dent Res* 2012; Dec; 91(12):1110-8.
21. Yao Y, Berg EA, Costello CE, Troxler RF, Oppenheim FG. Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *J Biol Chem*. 2003 Feb 14; 278(7): 5300-8.
22. Ribeiro TR, Dria KJ, de Carvalho CB, Monteiro AJ, Fonteles MC, de Moraes CK, Fonteles CS. Salivary peptide profile and its association with early childhood caries. *Int J Paediatr Dent* 2013; 23(3): 225–234.

- 23.Si Y, Ao S, Wang W, Chen F, Zheng S. Magnetic bead-based salivary peptidome profiling analysis for severe early childhood caries. *Caries Res* 2015; 49(1): 63-9.
- 24.Hart TC, Corby PM, Hauskrecht M, Hee Ryu O, Pelikan R, Valko M et al. Identification of microbial and proteomic biomarkers in early childhood caries. *Int J Dent*. 2011; 2011: 196721.
- 25.Siqueira WL, Dawes C. The salivary proteome: challenges and perspectives. *Proteomics Clin Appl* 2011; 5:575-579.
- 26.Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis*. 2011; May; 17(4): 345–354.
- 27.Edgar WM. Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *Br Dent J* 1990; Aug 11-25; 169(3-4): 96-8.
- 28.Sreebny LM. Saliva in health and disease: an appraisal and update. *Int Dent J* 2000; June 50(3): 140-61.
29. Siqueira WL, Bermejo PR, Mustacchi Z, Nicolau J. Buffer capacity, pH, and flow rate in saliva of children aged 2-60 months with Down syndrome. *Clin Oral Investig*. 2005; Mar; 9(1): 26-9.
- 30.Dawes C, Kubieniec K. The effects of prolonged gum chewing on salivary flow rate and composition. *Arch Oral Biol* 2004 Aug; 49(8): 665-9.
- 31.Siqueira WL, Nicolau J. Stimulated whole saliva components in children with Down syndrome. *J Spec Care Dentist* 2002; Nov-Dec; 22(6):226-30.
32. Voelker MA, Simmer-Beck M, Cole M, Keeven E, Tira D. Preliminary findings on the correlation of saliva pH, buffering capacity, flow, Consistency and *Streptococcus mutans* in relation to cigarette smoking. *J Dent Hyg*. 2013 Feb;87(1):30-7.
- 33.Brandão CF, Oliveira VMB, Santos ARRM, da Silva TMM, Vilella VQC, Simas GGPP, et al. Association between sickle cell disease and the oral health condition of children and adolescents. *BMC Oral Health* 2018 Oct 20; 18(1): 169.
- 34.Cunha-Cruz J, Scott J, Rothen M, Mancl L, Lawhorn T, Brossel K, et al. Salivary characteristics and dental caries: evidence from general dental practices. *J Am Dent Assoc*. 2013; May; 144(5): e31-40.

35. Hayashida JN, Minami S, Moriyama M, Toyoshima T, Shinozaki S, Tanaka A et al. Differences of stimulated and unstimulated salivary flow rates in patients with dry mouth. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* 2015; 27: 96–101.
36. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J Prost Dent* 2001; 85(2): 162-9.
37. Al Kawas S, Rahim ZH, Ferguson DB. Potential uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease. *Arch Oral Biol* 2012; 57(1): 1-9.
38. Kohara EK. Estudo proteômico de saliva de adolescentes acometidos de lesões de cárie ativas em diferentes estágios de severidade. [Tese de Doutorado]. São Paulo. Universidade de São Paulo/ SP. 2016.
39. Levine MJ. Salivary macromolecules. A structure/ function synopsis. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 20; 694: 11-6.
40. Nikitkova AE, Haase EM, Scannapieco FA. Taking the starch out of oral biofilm formation: molecular basis and functional significance of salivary α -amylase binding to oral streptococci. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79(2): 416-23.
41. Moffa EB, Machado MA, Mussi MC, Xiao Y, Garrido SS, Giampaolo ET, Siqueira WL. In Vitro Identification of Histatin 5 Salivary Complexes. *PLoS One*. 2015; 6; 10(11): e0142517.
42. Fábrián TK, Hermann P, Beck A, Fejérdy P, Fábrián G. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int J Mol Sci*. 2012; 13(4): 4295-320.
43. Brandtzaeg P. Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? *Ann N Y Acad Sci*. 2007; Mar; 1098: 288-311.
44. Siqueira WL, Margolis HC, Helmerhorst EJ, Mendes FM, Oppenheim FG. Evidence of Intact Histatins in the *in vivo* Acquired Enamel Pellicle. *J Dent Res* 2010; 89(6): 626-630.
45. Oppenheim FG, Salih E, Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; Mar 1098: 22-50.
46. Vukosavljevic D, Custodio W, Del Bel Cury AA, Siqueira WL. The effect of histatin 5, adsorbed on PMMA and hydroxyapatite, on *Candida albicans* colonization. *Yeast* 2012; 29: 459-466.

47. Levine M. Susceptibility to dental caries and the salivary proline-rich proteins. *Int J Dent*. 2011; 953412.
48. Banderas-Tarabay JA, Zacarías-D'Oleire IG, Garduño-Estrada R, Aceves-Luna E, González-Begné M. Electrophoretic analysis of whole saliva and prevalence of dental caries. A study in Mexican dental students. *Arch Med Res*. 2002; Sep-Oct; 33(5): 499-505.
49. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Princípios da Bioquímica*. São Paulo: Artmed; 2011.
50. Louvrien R, Matulis D. Assays for total protein. *Curr protoc microbiol* 2005; Oct; Appendix 3A.
51. Walker JM. *The protein protocols handbook*. 2nd Ed. Totowa: Humana Press; 2007.
52. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of proteins using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; Oct 150(1): 76-85. Erratum in *Anal Biochem* 1987; May 15; 163(1): 279.
53. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug; 227(5259): 680-5.
54. Davies HS, Pudney PDA, Georgiades P, Waigh TA, Hodson NW, Ridley CR, et al. Reorganization of the salivary mucin network by dietary components: insights from green tea polyphenols. *PLoS ONE* 2014; 9(9): e108372.
55. McDonald EE, Goldberg HA, Tabbara N, Mendes FM, Siqueira WL. Histatin 1 Resists Proteolytic Degradation when Adsorbed to Hydroxyapatite. *J Dent Res* 2011; 90(2): 268-272.
56. Oppenheim FG, Xu T, Mc Millian FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD, et al. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1988; Jun; 263(16): 7472-7.
57. Baum BJ, Bind JL, Longton RW. Polyacrilamide gel electrophoresis of human salivary histidine-rich-polypeptides. *J Dent Res* 1997; Sept; 56(9): 1115-8.
58. Lamy E, Costa AR, Antunes CIM, Vitorino R, Amado F. Protein electrophoresis in saliva study. In: Ghowsi K. *Electrophoresis*. Rijeka: InTech; 2012.

59. Helmerhort EJ, Alagl AS, Siqueira WL, Oppenheim FG. Oral fluid proteolytic effects on histatin 5 structure and function. *Arch Oral Biol* 2006; 51(12): 1061-70.
60. Xiao H, Zhang L, Zhou H, Lee JM, Garon EB, Wong DTW. Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11(2): M111.012112.
61. Bhalla S, Tandon S, Styamoorthy K. Salivary proteins and early childhood caries: A gel electrophoretic analysis. *Contemp Clin Dent* 2010; 1(1): 17-22.
62. Zehetbauer S, Wojahn T, Hiller KA, Schmalz G, Ruhl S. Resemblance of salivary protein profiles between children with early childhood caries and caries-free controls. *Eur J Oral Sci* 2009; 117: 369-373.
63. Misra S, Tahmassebi J, Brosman M. Early childhood caries - a review. *Dent Update* 2007; 34: 556-8.
64. Touger-Decker R, van Loveren C. Sugars and dental caries. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 881S-892S.
65. Brasil. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003- Resultados Principais. Acesso: 16/09/2008. <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/projetosb2004.pdf>.
66. Bönecker M, Marcenes W, Sheiham A. Caries reductions between 1995, 1997 and 1999 in preschool children in Diadema, Brazil. *Int J Paediatr Dent*. 2002; 12:183-8.
67. Dini EL, Holt RD, Bedi R. Caries and its association with infant feeding and oral health related behaviors in 3-4-year-old Brazilian children. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2000; 28:241-8.
68. American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on Behavior Guidance for the Pediatric Dental Patient, 2011 <http://www.aapd.org/media/PoliciesGuidelines/GBehavGuide.pdf>.
69. Pitts NB, Stamm JW. International Consensus Workshop on Caries Clinical Trials (ICW-CCT)-final consensus statements: agreeing where the evidence leads. *J Dent Res* 2004; 83 Spec No C:C125-8.
70. Braga MM, Mendes FM, Ekstrand KR. Detection activity assessment and diagnosis of dental caries lesions. *Dent Clin North America* 2010 Jul;54(3): 479-93.

- 71.Frencken JE. The state-of-the-art of ART restorations. Dent Update 2014 April; 41(3): 218-20, 222-4.
- 72.Frencken JE, Flohil KA, de Baat C. The history and scientific development of atraumatic restorative treatment. Ned Tijdschr Tandheelkd. 2013; 120(12): 677-81.
- 73.Frencken JE, Flohil KA, de Baat C. Atraumatic restorative treatment in relation to pain, discomfort and dental treatment anxiety. Ned Tijdschr Tandheelkd. 2014 Jul-Aug; 121(7-8): 388-93.
- 74.Frencken, JE, Holmgren CJ. Tratamento restaurador atraumático (ART) para a cárie dentária. São Paulo: Santos, 2001. 106p.
- 75.Borghini GN, Rodrigues LP, Lopes LM, Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Nobre-dos-Santos M. Relationship among α amylase and carbonic anhydrase VI in saliva, visible biofilm, and early childhood caries: a longitudinal study. Int J Paed Dent 2017; 27: 174-182.
- 76.Sun X, Huang X, Tan X, Si Y, Wang X, Chen F and Zheng S. Salivary peptidome profiling for diagnosis of severe early childhood caries. J Transl Med 2016; 14:240.
- 77.Shimazaki Y, Fu B, Yonemoto K, Akifusa S, Shibata Y, Takeshita T et al. Stimulated salivary flow rate and oral health status. J Oral Sci. 2017; 59(1):55-62.
- 78.Tulunoglu O, Demirtas S, Tulunoglu I. Total antioxidant levels of saliva in children related to caries, age, and gender. Int J Paed Dent 2006; 16(3); 186-191.
- 79.Nyvad B, Kilian M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. Caries Res 1990; 24(4): 267–272.
- 80.Nyvad B, Machiulskiene V, Baelum V. Construct and predictive validity of clinical Caries diagnostic criteria assessing lesion activity. J Dent Res 2003; 82(2): 117-122.
- 81.Hannigan A, Lynch CD. Statistical methodology in oral and dental research: pitfalls and recommendations. J Dent Res 2013; 41(5): 385-92.
- 82.Larson R, Farber B. Estatística aplicada 2016; 6ª Ed; São Paulo: Pearson Prentice Hall.
- 83.Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. J Dent Res 2015; 94(5): 650-8.

84. Qiu R, Li W, Lin Y, Yu D, Zhao W. Genotypic diversity and cariogenicity of *Candida albicans* from children with early childhood caries and caries-free children. *BMC Oral Health* 2015; 15: 144.
85. Gao X, Jiang S, Koh D, Hsu CYS. Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontology* 2000; 2016: 128-141.
86. Vitorino R, Calheiros-Lobo MJ, Duarte JA, Domingues P, Amado F. Salivary clinical data and dental caries susceptibility: is there a relationship? *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.* 2006;47(1):27–33.
87. Freitas MCCA, Fagundes TC, Modena KCDS, Cardia GS, Navarro MFL. Randomized clinical trial of encapsulated and hand-mixed glass-ionomer ART restorations: one-year follow-up. *J Appl Oral Sci.* 2018 Jan 18; 26: e20170129.
88. de Amorim RG, Frencken JE, Raggio DP, Chen X, Hu X, Leal SC. Survival percentages of atraumatic restorative treatment (ART) restorations and sealants in posterior teeth: an updated systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2018; Nov; 22(8): 2703-2725.
89. Hesse D, Bonifácio CC, Kleverlaan CJ, Raggio DP. Clinical wear of approximal glass ionomer restorations protected with a nanofilled self-adhesive light-cured protective coating. *J Appl Oral Sci.* 2018; Oct 4; 26: e20180094.
90. Chen KJ, Gao SS, Duangthip D, Lo ECM, Chu CH. Managing Early Childhood Caries for Young Children in China. *Healthcare (Basel)* 2018; Jan 30; 6(1).
91. Arrow P, McPhee R, Atkinson D, Mackean T, Kularatna S, Tonmukayakul U, et al. Minimally Invasive Dentistry Based on Atraumatic Restorative Treatment to Manage Early Childhood Caries in Rural and Remote Aboriginal Communities: Protocol for a Randomized Controlled Trial. *JMIR Res Protoc.* 2018; Jul 25; 7(7): e10322.
92. Mickenautsch S, Yengopal V, Banerjee A. Atraumatic restorative treatment versus amalgam restoration longevity: a systematic review. *Clin Oral Investig.* 2010 Jun;14(3):233-40.
93. Hemadi AS, Huang R, Zhou Y, Zou J. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. *Int J Oral Sci* 2017; 9(11).

94. Masoumch M, Sattari M, Kooshki F, Fotuhi F, Modarrest N, Khalili Z et al. Relationship of salivary lactoferrin and lysozyme concentrations with Early Childhood Caries. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 2015 Spring; 9(2): 109–114.
95. Jurczak A, Koscielniak D, Papiez M, Vyhouskaya P and Krzysciak W. A study on β -defensin-2 and histatin-5 as a diagnostic maker of early childhood caries progression. *Biol Res* 2015; 48:61.
96. Nyvad B, Kilian M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res* 1990; 24(4): 267–272.
97. Tian C, Sun X, Liu X, Huan X, Chen F, Zheng S. Salivary peptidome profiling analysis for occurrence of new carious lesions in patients with severe early childhood caries. *PLoS One*. 2017; 12(8): e0182712.
98. Vukosavljevic D, Hutter JL, Helmerhorst EJ, Xiao Y, Custodio W, Zaidan FC et al. Nanoscale Adhesion Forces between Enamel Pellicle Proteins and Hydroxyapatite. *J Dent Res* 2014; 1-6.
99. Martins C, Buczynski AK, Maia LC, Siqueira WL, Castro GF. Salivary proteins as a biomarker for dental caries—a systematic review. *J Dent* 2013; 41(1): 2–8.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PÁGINAS 1 E 2)



Universidade de Brasília
Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências da Saúde

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

O (a) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa vinculado(a) ao Programa da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília: “Diferenças entre proteínas salivares de pré-escolares sem e com experiência de Cárie Severa na Infância antes e após Tratamento Restaurador Atraumático”.

O objetivo desta pesquisa é comparar a saliva coletada de crianças que possuam cáries com a saliva das que não possuam cáries para detectar se há diferenças na composição. O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que o seu nome e o nome do seu(sua) filho(a) não aparecerá, sendo mantido o rigoroso sigilo de quaisquer informações que permitam identificá-los(as).

A participação do seu(sua) filho(a) é voluntária e será realizada após exame clínico inicial para saber se ele tem cárie dentária. Você e seu(sua) filho(a) receberão mensagem com as datas de visita da pesquisadora na escola. Seu(sua) filho(a) permanecerá uma hora sem comer e beber e, em seguida, será coletada a saliva dele(a), de duas formas, estimulada e não-estimulada, pelo profissional treinado. Da forma estimulada, seu filho(a) receberá um papel para mastigar e irá cuspir em um recipiente próprio esterelizado. Da forma não-estimulada, será através de um sugador flexível que fará a sucção da saliva com uma bomba à vácuo.

Se seu filho(a) possuir cárie dentária, ele terá o benefício de receber tratamento chamado de Tratamento Restaurador Atraumático e Fluoterapia com verniz fluoretado, no Centro de Educação Infantil 01 da Estrutural. Esse tratamento será realizado por profissionais treinados para lidar com crianças até 6 anos, que farão a curetagem de todo o tecido cariado do dente, com instrumental esterelizado apropriado, seguido pela inserção de material restaurador nas lesões de cárie dentária cavitadas. Nas lesões de cárie dentária ativa, manchas brancas e castanhas, será realizada a limpeza e secagem da superfície do dente, seguida pela aplicação de Verniz Fluoretado. Se seu(sua) filho(a) tiver recebido tratamento, passará por nova coleta de saliva 2 meses após a realização da restauração. Vocês novamente receberão as datas das visitas da profissional na escola.

O risco do seu(sua) filho(a) realizar a coleta de saliva e a fluoterapia com verniz fluoretado é sentir desconforto, porém, se isso ocorrer, o procedimento será interrompido. O risco de seu(sua) filho(a) realizar o Tratamento Restaurador Atraumático é de não aceitar a realização do procedimento e não aceitar receber anestesia, caso possua cárie muito profunda e extensa, situação em que o procedimento será suspenso. Informamos que seu(sua) filho(a) pode se recusar a responder, pode não querer participar de qualquer procedimento ou qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento, sem nenhum prejuízo para ele(a) ou para o(a) Sr(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Todas as despesas que você tiver relacionadas diretamente ao projeto de pesquisa (tais como, passagem para o local da pesquisa, alimentação ou exames para realização da pesquisa) serão cobertas pelo pesquisador responsável.

Caso haja algum dano direto ou indireto decorrente de sua participação na pesquisa, você poderá ser indenizado, obedecendo-se as disposições legais vigentes no Brasil.

Rúbrica do pesquisador: _____

Rúbrica do responsável pelo participante da pesquisa: _____



Universidade de Brasília
Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências da Saúde

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Pós-graduação da Faculdade de Ciências da Saúde da UNB podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de no mínimo cinco anos, após isso serão destruídos ou mantidos na instituição. O acesso ao prontuário de seu(sua) filho(a) é permitido ao responsável.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros, na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília no telefone (61) 9674-4173 e (61) 3107-1702, ou se preferir, pelo email drpatriciamedeiros@hotmail.com ou sorayaodt@yahoo.com.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde (CEP/FS) da Universidade de Brasília. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidos pelo telefone (61) 3107-1947 ou do e-mail cepfs@unb.br ou cepfsunb@gmail.com, horário de atendimento de 09:00h às 12:00h e de 13:30h às 15:30h, de segunda a sexta-feira. O CEP/FS se localiza na Faculdade de Ciências da Saúde, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Asa Norte.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o responsável pelo participante da pesquisa.

Brasília, ____ de _____ de _____

Assinatura do responsável pelo participante da Pesquisa

Assinatura da Pesquisadora responsável
Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros

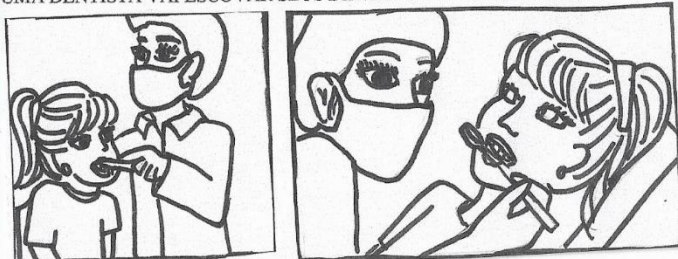
APÊNDICE 2 – TERMO DE ASSENTIMENTO



Universidade de Brasília
Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências da Saúde

TERMO DE ASSENTIMENTO DA PESQUISA: “Diferenças entre proteínas salivares de pré-escolares sem e com experiência de Cárie Severa na Infância”

UMA DENTISTA VAI ESCOVAR SEUS DENTES E OLHAR A SUA BOCA



A CRIANÇA QUE ESTIVER COM TODOS OS DENTINHOS SEM BURQUINHOS, A DENTISTA VAI PEGAR A ÁGUA DA BOCA, A SALIVA



DEPOIS, A DENTISTA VAI DAR UM PAPELZINHO PARA VOCÊ MASTIGAR E VAI PEDIR PARA VOCÊ CUSPIR NUM POTINHO

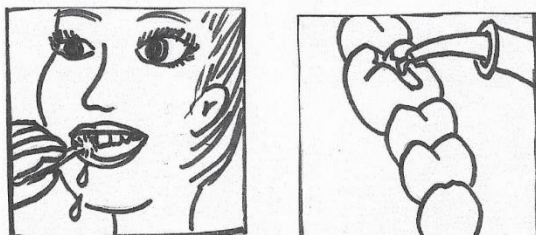


VOCÊ PODE PARTICIPAR DE TUDO COM A DENTISTA, DIZENDO “SIM”, OU VOCÊ PODE DIZER “NÃO”, SEM NINGUÉM FICAR BRAVO

A DENTISTA VAI POR UM CANUDINHO QUE CHUPA A ÁGUA DA SUA BOCA, A SALIVA, E VAI GUARDAR NUM POTINHO



A DENTISTA VAI PINTAR AS MANCHINHAS BRANCAS E TAMPAR OS BURQUINHOS COM UMA MASSINHA



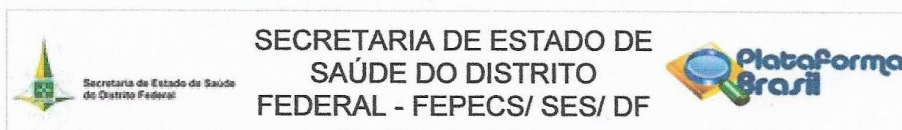
de _____ de 201__

Impressão digital do Participante

Assinatura da pesquisadora responsável

ANEXOS

ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA – FS/UNB (PÁGINAS 1 A 6)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Diferenças entre proteínas salivares de pre-escolares sem e com experiência de Cárie Severa na Infância antes e após Tratamento Restaurador Atraumático

Pesquisador: Patrícia Bastos de Vasconcelos de Medeiros

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 47603415.5.3001.5553

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Patrocinador Principal: FUNDACAO UNIVERSIDADE DE BRASILIA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.377.198

Apresentação do Projeto:

A cárie é uma das doenças crônicas de maior prevalência na população, independente da idade, sexo e raça e de origem multifatorial. Entretanto, tem-se observado uma tendência de queda nos índices de cárie dentária no Brasil e em outros países.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a composição proteica da saliva, estimulada e não-estimulada, em crianças livre de cárie e com presença de cárie severa.

Objetivo Secundário:

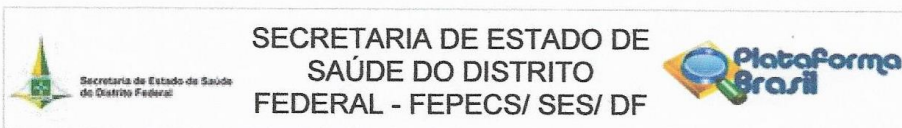
Avaliar quais as diferenças na composição proteica da saliva, estimulada e não-estimulada, e fluxo salivar em crianças livre de cárie e com presença de cárie severa, antes e após receberem tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta de saliva, estimulada e não estimulada, e a fluoroterapia possuem o risco de causar desconforto ao paciente. Nesse caso, a coleta ou a aplicação de flúor serão interrompidas e a criança terá a sua participação na pesquisa dispensada. Em relação ao ART, para ser realizado em

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE **CEP:** 70.710-904
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.377.198

lesões cavitadas muito profundas, há o risco de que seja necessário o uso de anestesia local.

Benefícios:

O verniz fluoretado tem sido bastante empregado, na dentição decídua e dentição mista, pela facilidade de aplicação e baixa toxicidade. Possui a propriedade de inibir a desmineralização, sendo os benefícios específicos obtidos pelas crianças participantes do estudo a redução da incidência de cárie e a remineralização de lesões de mancha branca ativa. A remineralização dos tecidos dentários pela ação do flúor vem sendo abordada como

mais eficaz em associação à outras substâncias. Sistemas de materiais contendo fluoreto associado a outros componentes têm sido desenvolvidos no sentido de ampliar a disponibilidade de cálcio e fosfato, interferindo na composição dos biofilmes da superfície do esmalte. Para esse fim, o desenvolvimento de formulações anti-placa bacteriana levou à descoberta de compostos com significativas propriedades antimicrobianas. O Tratamento Restaurador Atraumático foi escolhido por constituir um tratamento restaurador definitivo de baixo custo que possui boa aplicação na dentição decídua pelas propriedades do cimento de ionômero de vidro e aplicabilidade da intervenção em crianças na primeira infância. O benefício específico aos participantes do estudo será receber tratamento que propicia a intervenção pouco invasiva, a prevenção e interceptação precoce de lesões de cárie, e raramente requer anestesia para a sua realização. Pode ser bem utilizada em situações de recurso limitado e instalações com pouca ou nenhuma energia elétrica. Requer um treinamento rápido e simples para a realização do procedimento.

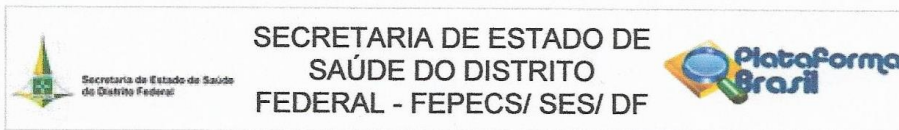
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Crianças matriculadas no Centro de Educação Infantil 1 da Estrutural serão aleatoriamente submetidas ao exame clínico, receberão códigos de registro de cárie segundo o critério Nyvad e o exame seguirá até que sejam formados 2 grupos: G1-30 crianças livre de cárie (Nyvad cód.0) e G2-30 crianças com lesão de cárie ativa em dentina (Nyvad cód.3). Os pais dos selecionados receberão um Termo de Consentimento. Participarão da pesquisa as crianças cujos pais assinaram o referido termo. A saliva estimulada e não-estimulada dos pre-escolares será coletada em dois dias consecutivos pela manhã, das 9 às 10h, para minimizar o efeito do ritmo circadiano e 2h após a última refeição. A saliva não estimulada será coletada com um catéter plástico macio, conectado a uma bomba de sucção introduzida na cavidade bucal das crianças.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Apresentou folha de rosto de acordo;
- Termo de concordância de acordo;

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
 Bairro: ASA NORTE CEP: 70.710-904
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3325-4955 Fax: (33)3325-4955 E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.377.198

- Currículos adequados;
- TCLE apresentado;
- A apresentou riscos e benefícios de acordo;
- Cronograma e Planilha de orçamento de acordo;
- Respondeu às pendências solicitadas.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

-Respondeu às pendências solicitadas adequadamente. PROJETO APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

-Respondeu às pendências solicitadas adequadamente. PROJETO APROVADO.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_448547.pdf	08/10/2015 11:32:46		Aceito
Outros	Carta_de_Resposta_a_Pendencias_5_10_15.docx	08/10/2015 11:32:12	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_448547.pdf	05/10/2015 15:12:11		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Proposta_de_Doutorado_Completa5_10_15.docx	05/10/2015 15:10:40	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_5_10_15.docx	05/10/2015 15:08:56	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
Outros	Termo_de_encaminhamento2_10_15.jpg	05/10/2015 15:04:52	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
Outros	Termo_de_concordancia_sesdf_2_10_15.jpg	05/10/2015 15:03:23	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	CEP_TCLE_final.docx	05/10/2015 14:53:12	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	CEP_TCLE_correcoes_em_vermelho.docx	05/10/2015 14:52:35	Patrícia Bastos de Vasconcellos de	Aceito

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

Bairro: ASA NORTE

CEP: 70.710-904

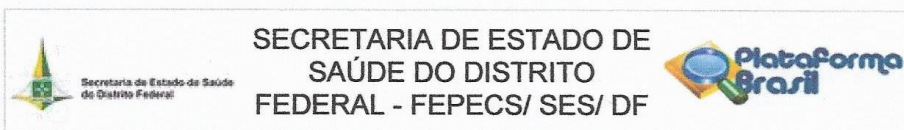
UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3325-4955

Fax: (33)3325-4955

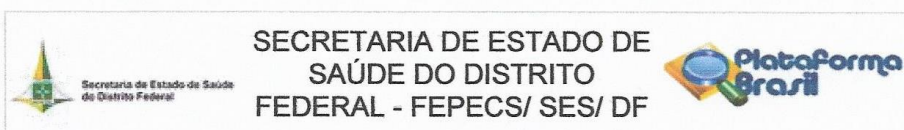
E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.377.198

Justificativa de Ausência	CEP_TCLE_correcoes_em_vermelho.docx	05/10/2015 14:52:35	Medeiros	Aceito
Outros	Carta_de_Resposta_a_Pendencias5_10_15.docx	05/10/2015 14:50:32	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_448547.pdf	24/08/2015 14:53:25		Aceito
Outros	CartaRespostaPendencias24_08_15.doc	24/08/2015 14:52:37	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_448547.pdf	18/08/2015 17:07:00		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	CEP_TCLE_final.docx	18/08/2015 17:02:22	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Proposta_de_Doutorado_Completa.docx	18/08/2015 16:55:51	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
Outros	curriculolattesPatriciaMedeiros.pdf	18/08/2015 16:54:59	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Soraya_Coelho_Leal.pdf	18/08/2015 16:51:55	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
Outros	Termo_de_Concordancia_do_Laboratorio.jpg	18/08/2015 16:48:28	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
Outros	Termo_de_Responsabilidade.jpg	18/08/2015 16:45:59	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
Outros	Termo_de_Assentimento.jpg	18/08/2015 16:44:47	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
Outros	CEPTermo_de_Concordancia_Secretaria_e_Educa_18_05_15.jpg	18/08/2015 16:24:57	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
Outros	CEPTermo_Concordancia_Secretaria_de_Educa_18_08_15.doc	18/08/2015 16:23:47	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
Outros	CEPTermo_de_Encaminhamento_18_05_15.jpg	18/08/2015 16:19:35	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
Outros	CEP_CARTA_DE_ENCAMINHAMENTO_18_08_15.doc	18/08/2015 16:18:23	Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto_18_08_15.docx	18/08/2015 16:09:03	Patrícia Bastos de Vasconcellos de	Aceito

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
 Bairro: ASA NORTE CEP: 70.710-904
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3325-4955 Fax: (33)3325-4955 E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.377.198

Folha de Rosto	FolhadeRosto_18_08_15.docx	18/08/2015 16:09:03	Medeiros	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_448547.pdf	27/07/2015 22:07:29		Aceito
Outros	Termo de Assentimento em folha única.jpg	27/07/2015 22:06:18		Aceito
Outros	CEP Termo de Encaminhamento.jpg	27/07/2015 21:50:13		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_448547.pdf	27/07/2015 14:46:00		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.jpg	21/07/2015 15:01:02		Aceito
Outros	Folha de rosto.jpg	21/07/2015 14:58:45		Aceito
Outros	curriculo lattes Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros.pdf	21/07/2015 14:56:25		Aceito
Outros	Curriculo Lattes Soraya Coelho leal.pdf	21/07/2015 14:55:24		Aceito
Outros	Assinatura da secretaria de educação.jpg	21/07/2015 14:54:29		Aceito
Outros	Termo de Concordância Secretaria de Educação assinado.doc.docx	29/06/2015 15:14:05		Aceito
Outros	Termo de Concordância Assinada da Diretora.jpg	29/06/2015 14:57:29		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_448547.pdf	26/06/2015 17:10:30		Aceito
Outros	CEP TermoConcord da ESCOLA CEPFS 03.2015.doc	26/06/2015 17:06:39		Aceito
Outros	Termo de Responsabilidade e Compromisso.jpg	26/06/2015 17:05:42		Aceito
Outros	CEP Declaracao de Responsabilidade.docx	26/06/2015 17:03:33		Aceito
Outros	Termo de Concordância Secretaria de Educação.doc	26/06/2015 17:00:55		Aceito
Outros	Termo de Concordância do Laboratório.jpg	26/06/2015 16:59:37		Aceito
Outros	CEP Termo de concordancia de instituicao (LABORATORIO) coparticipante.doc	26/06/2015 16:58:59		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Proposta de Doutorado Completa.docx	26/06/2015 16:53:55		Aceito
Outros	Assentimento 2 de 2.jpg	26/06/2015 16:53:02		Aceito
Outros	Assentimento 1 de 2.jpg	26/06/2015 16:52:00		Aceito
TCLE / Termos de	CEP TCLE final.docx	26/06/2015		Aceito

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

Bairro: ASA NORTE

CEP: 70.710-904

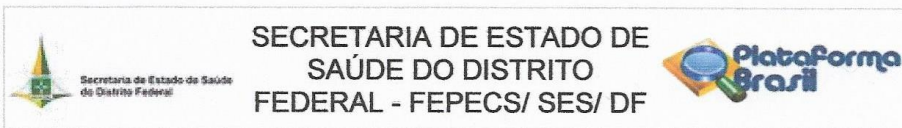
UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3325-4955

Fax: (33)3325-4955

E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.377.198

Assentimento / Justificativa de Ausência	CEP TCLE final.docx	16:50:32		Aceito
--	---------------------	----------	--	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:




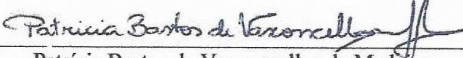
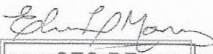
Não

BRASILIA, 20 de Dezembro de 2015

Assinado por:
Helio Bergo
(Coordenador)

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
 Bairro: ASA NORTE CEP: 70.710-904
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3325-4955 Fax: (33)3325-4955 E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com

ANEXO 2 – TERMO DE ANUÊNCIA DA SECRETARIA DE ESTADO DE EDUCAÇÃO DO DISTRITO FEDERAL (PÁGINAS 1 E 2)

	<p>GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde</p>	
 <p>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</p>		
<p>TERMO DE ANUÊNCIA DA INSTITUIÇÃO COPARTICIPANTE</p>		
<p>A Eliene Lopes Moreira , coordenadora de Saúde e Assistência ao Estudante – SIAE/SE-DF, vinculada à Secretaria de Estado de Educação do Distrito Federal está de acordo com a realização, nesta instituição, da pesquisa “Diferenças entre proteínas salivares de pré-escolares sem e com experiência de Cárie Severa na Infância antes e após Tratamento Restaurador Atraumático”, de responsabilidade do(a) pesquisador(a) Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros, com a finalidade avaliar diferenças entre a composição salivar através de exames laboratoriais de saliva coletada de pré-escolares matriculados no Centro de Educação Infantil 01 da Estrutural, com previsão de início em no segundo semestre do ano letivo de 2105.</p>		
<p>O estudo envolve:</p> <ul style="list-style-type: none"> (x) realização de entrevistas; () administração de medicamentos; (x) procedimentos clínicos odontológicos; (x) exames laboratoriais ou de imagem; (x) pesquisa em prontuários; (x) outro: coleta de saliva 		
<p>O pesquisador responsável informa que o projeto de pesquisa está sendo analisado pelo CEP da Instituição Proponente (Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde da UNB) e está ciente que as etapas do estudo envolvendo a SES-DF ou Entidades Vinculadas, somente poderão ser iniciadas após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde/FEPECS-DF.</p>		
<p>Brasília, 16/06/2015</p>		
<p>Pesquisador responsável: _____</p>	 Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros	
<p>Representante da SEDF: _____</p>	 <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;"> SES-DF Assinatura/Carimbo SIAE/SE-DF </div>	
<p>1</p>		



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

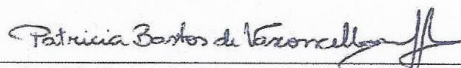
A/C: Exma. Sra. Júlia Maria Rebello Mandarino,

Encaminho à subsecretária, da Subsecretaria de Infraestrutura e Apoio Educacional, o Termo de Anuência da Instituição Co-participante que aprova a realização da pesquisa “Diferenças entre proteínas salivares de pré-escolares sem e com experiência de Cárie Severa na Infância antes e após Tratamento Restaurador Atraumático”, vinculada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós graduação da Universidade de Brasília, no Centro de Educação Infantil 01 da Estrutural conforme as descrições contidas no Termo.

O pesquisador responsável informa que o projeto de pesquisa está sendo analisado pelo CEP da Instituição Proponente (Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde da UNB) e **está ciente que as etapas do estudo envolvendo a SES-DF ou Entidades Vinculadas, somente poderão ser iniciadas após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde/FEPECS-DF.**

Brasília, 08/06 /2015

Pesquisador responsável:


Patrícia Bastos de Vasconcellos de Medeiros