



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Centro de Ciência da Saúde
Faculdade de Odontologia
Departamento de Odontopediatria e Ortodontia

**AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DE IMUNOGLOBULINA A
SECRETÓRIA EM CRIANÇAS COM CÁRIE APÓS TRATAMENTO
RESTAURADOR**

ALINE DOS SANTOS LETIERI

Rio de Janeiro
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Centro de Ciência da Saúde
Faculdade de Odontologia
Departamento de Odontopediatria e Ortodontia

ALINE DOS SANTOS LETIERI

**AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DE IMUNOGLOBULINA A
SECRETÓRIA EM CRIANÇAS COM CÁRIE APÓS TRATAMENTO
RESTAURADOR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (Área de Concentração: Odontopediatria) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Área de Concentração: Odontopediatria).

Orientadoras:
Prof^a. Dr^a. Ivete Pomarico Ribeiro de Souza
Prof^a. Dr^a. Tatiana Kelly da Silva Fidalgo

Rio de Janeiro
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Letieri, Aline dos Santos

Avaliação longitudinal de imunoglobulina A secretória em crianças com cárie após tratamento restaurador / Aline dos Santos Letieri. - Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Odontologia, 2016.

77 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Ivete Pomarico Ribeiro de Souza e Tatiana Kelly da Silva Fidalgo.

Dissertação (mestrado) – UFRJ, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-graduação em Odontologia, Odontopediatria, 2016.

Referências bibliográficas: f. 61-65.

1. Imunoglobulina A Secretora - análise. 2. Saliva - imunologia. 3. Cárie Dentária. 4. Pré-Escolar. 5. Streptococcus mutans. 6. Lactobacillus. 7. Odontopediatria - Tese. I. Souza, Ivete Pomarico Ribeiro de. II. Fidalgo, Tatiana Kelly da Silva. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-graduação em Odontologia, Odontopediatria. IV. Título.

“Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton

DEDICATÓRIA

À minha amada mãe, **Vania Antonia dos Santos**, que sempre foi meu exemplo de mãe, mulher e profissional; de esforço, luta e perseverança; de bondade, amor e generosidade. Agradeço por sempre ter me apoiado e incentivado, por acreditar em mim, me dar suporte nos momentos mais difíceis e por todos os sacrifícios que fez para que eu alcançasse meus objetivos. Sem você e seu imenso amor eu não teria conseguido.

Ao meu amor, **Júlio César Machado Bueno**, que é meu companheiro de vida; que está sempre comigo, com quem eu sempre pude contar, que me ouve de modo tão paciente e me trata com tanto amor, que me ajuda e ampara nas situações difíceis, que nunca duvidou da minha capacidade. Seu apoio, companheirismo e honestidade foram fundamentais em todas as minhas conquistas.

Ao meu pai, **Marconi José Corrêa Letieri**, por ser exemplo de força e generosidade; por me ensinar a trabalhar duro, a não desistir, a conquistar meus objetivos com esforço e dedicação, por possibilitar que eu alcançasse minhas conquistas, me dando todo apoio e suporte necessários, e por sempre acreditar em mim e por tornar meus sonhos possíveis.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Ivete Pomarico Ribeiro de Souza**, por ter me escolhido e acreditado em mim. Agradeço pelos ensinamentos, pela confiança, carinho e respeito, por todas as oportunidades oferecidas, por ter tornado possível a realização desse trabalho e por me incentivar e apoiar sempre.

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Tatiana Kelly da Silva Fidalgo**, por ter me ensinado tanto e por estar sempre presente e solícita. Agradeço pela paciência e boa vontade que teve em sanar minhas dúvidas e por estar sempre disposta a discutir os assuntos comigo de modo tão carinhoso. Certamente esse trabalho não seria possível sem seu esforço e dedicação.

À minha colaboradora, **Prof^a. Dr^a. Liana Bastos de Freitas Fernandes**, por estar tão presente, tendo colaborado de maneira intensa em todo o trabalho, e pelas oportunidades que me ofereceu. Agradeço por toda a contribuição recebida e por ter sido tão carinhosa comigo durante esse trajeto.

A todos os **pacientes e responsáveis** que participaram da pesquisa e possibilitaram a realização desse trabalho. Sem o comprometimento de vocês, isso jamais seria possível. Muito obrigada a todos por acreditarem e confiarem em mim e por terem sido sempre tão amorosos e parceiros durante esse período. Minha eterna gratidão e respeito a todos vocês.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ter me concedido tantas oportunidades, por ter colocado pessoas tão incríveis e especiais ao meu redor, por tantas bênçãos já recebidas e por ser meu amparo nos momentos de dificuldade.

À minha família, meus pais **Vania** e **Marconi**, e meu namorado **Júlio**, por terem sido a base que me possibilitou chegar até aqui.

Aos meus irmãos, **Renato Lopes Letieri** e **Miguel Lopes Letieri**, por serem fonte de amor, de esperança e motivação.

Aos meus avós paternos, **Marconi Letieri** e **Neusa Corrêa Letieri**, por terem sido meus primeiros incentivadores, por terem me estimulado, me encorajado e me amado de modo único. E aos meus avós maternos **Lourival José dos Santos** e **Iolanda Tavares dos Santos**, pelo exemplo de esforço e superação e pelo amor recebido.

A todos os meus **tios e tias**, por serem tão presentes e amorosos, por me ajudarem, incentivarem e torcerem pelo meu sucesso. A todos os meus **primos e primas**, por serem parte fundamental da minha história, compartilhando as alegrias e dando suporte nas dificuldades.

Aos meus sogros **Júlio César Marcondes Bueno** e **Ana Paula Marcondes Bueno**, por me amarem e me tratarem como filha.

Às minhas amigas da escola, **Aline Reis** e **Herika Cristina**, por todo amor, compreensão, companheirismo e pelos momentos maravilhosos compartilhados.

Aos meus amigos de faculdade, **Caio Wierzchon**, **Eduardo Barbosa**, **Carlos Alberto Fravoline**, **Pedro Bollentini**. E, em especial, aos amigos

Bernardo von Held, Elinton Moura e Roberto Santos, por serem tão presentes e especiais. Às amigas de faculdade, **Lívia Paes Borges, Natália dos Santos Oshiro e Vanessa Moreira Andrade**, por serem companheiras, parceiras, por dividirem conhecimento e por toda amizade e amor recebidos.

À minha querida amiga **Lílian Siqueira de Lima**, por ser dupla na faculdade e na vida; por me ouvir, me acalmar, por ter sempre uma palavra de carinho e conforto, por me dar força e por ser tão fundamental na minha vida.

À amiga de trabalho, **Crislaine de Andrade Ranquine**, por ter me ensinado tanto, pela humildade e simplicidade e por ter me tratado sempre com carinho e respeito. E aos amigos da CSF Herbert de Souza, em especial à **Ana Kátia, Carmen Marins, Claire Marie Pedroso, Clara Menucci, Daniele Andrade, Debora Lima, Fabiano Machado e Luciene Afonso**, por me ajudarem a crescer profissional e pessoalmente e por sempre serem pessoas tão especiais e amorosas.

A todos os **professores da FO – UFRJ**, por terem transmitido conhecimento de qualidade de modo eficiente e humano e por nos ajudarem a atender os pacientes de modo integral e resolutivo. E a todos os **funcionários da FO – UFRJ**, pelo tratamento educado e pelo trabalho que executam.

Ao **Dr. Altair Dantas de Andrade**, por ser motivação, exemplo, amigo e incentivador; pelas oportunidades concedidas, pela confiança e pelo carinho de sempre. À **Dra. Adriene Baldez**, por ser dentista, amiga, parceira, incentivadora, pelas conversas e conselhos e por sua valiosa amizade. E a todos os dentistas da **Clínica Definitiva Odontologia**, pelo apoio, amizade e carinho.

Ao **Prof. Dr. Fábio Almeida** e à **Prof^a. Dr^a. Ana Paula Valente**, diretores científicos do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas – UFRJ, por terem tornado possível a realização desse trabalho. Obrigada por serem parceiros, por estarem sempre dispostos a ajudar e por

terem contribuído de maneira tão importante nessa etapa.

À **Prof^a. Dr^a. Vera Ligia Vieira Mendes Sovieiro**, por ter aceito tão gentilmente o convite para participar da minha banca avaliadora. Apesar do pouco convívio, admiro a inteligência e cortesia da senhora ao avaliar os trabalhos científicos, sempre com olhar atento e observações pertinentes.

À **Prof^a. Dr^a. Glória Fernanda Barbosa de Araújo Castro**, por ser mestre e amiga. Obrigada por todo carinho, pelas conversas, por todos os conselhos e ensinamentos. Admiro seu jeito leve e bem-humorado de levar a vida, sem deixar de ser responsável e competente no que faz, e o modo carinhoso e comprometido com que a senhora atende os pacientes especiais.

À **Prof^a. Dr^a. Lucianne Cople Maia**, por me ensinar a ter pensamento crítico, me estimular a ir mais longe e fomentar o desejo pela ciência. Admiro o modo humano e cuidadoso com que a senhora conduz os atendimentos clínicos. Agradeço pelas oportunidades que me ofereceu, por acreditar em mim e me dar reconhecimento.

À **Prof^a. Dr^a. Laura Guimarães Primo**, por dividir conhecimentos acadêmicos e experiências de vida, pelo modo carinhoso com que sempre me tratou, pelos momentos de descontração e por todo os ensinamentos transmitidos.

Ao **Prof. Dr. Rogério Gleiser**, por compartilhar sua sabedoria de modo simples, humilde e cordial, pelas valiosas considerações nos seminários e por ser sempre tão solícito e carinhoso comigo.

A todos os demais professores do Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da UFRJ, **Prof^a. Dr^a. Aline de Almeida Neves**, **Prof^a. Dr^a. Andréa Gonçalves Antonio**, **Prof^a. Dr^a. Luciana Pomarico Ribeiro**, **Prof. Dr. Marcelo de Castro Costa** e **Prof^a. Dr^a. Carla Martins de Oliveira**, por todos os ensinamentos transmitidos, pela convivência e por terem contribuído muito para o meu aprendizado e crescimento durante esse período.

A todos os cirurgiões-dentistas, **Andréa Soares Quirino da Silva, Cláudia Maria Tavares da Silva, Fernanda Barja-Fidalgo, João Alfredo Farinhas, Maria Bárbara Carvalho Torres Guimarães, Maria da Encarnação Perez Requejo da Costa, Marta Teresinha Fornazari, Thomaz Chianca e Vanessa Maria de Souza e Silva**, por ajudarem, ensinarem e estarem sempre presentes e dispostos a ajudar.

A todos os demais funcionários do Departamento, **Andréa de Oliveira Seraphim, Edinaldo da Silva, João Carlos Monteiro, Luiza de Oliveira Queiróz, Maria Fernanda Muniz Freire, Maria Izabel do Amaral, Maria José Chagas, Rosemere Teixeira Roza, Robson Clovis de Azevedo e Marivangle de Assis Waltz**, por possibilitarem que nossas atividades fossem cumpridas, nos ajudando e nos tratando sempre com respeito e cordialidade, e pelos momentos divertidos e de descontração. Um agradecimento especial à **Kátia Monteiro Seixas Pereira**, que além de funcionária solícita, competente e simpática, se tornou uma amiga.

A todos os **alunos da disciplina de Odontopediatria I**, por sempre terem me tratado com respeito e carinho e por terem me acolhido de forma especial.

A **todos os alunos de doutorado**, em especial aos que se tornaram grandes amigos, **Adílís Alexandria, Adrielle Mangabeira, Clarissa Avelar, Michelle Ammari, Thaís Soares, Thiago Isidro**, que são pessoas incríveis, que me ajudaram muito durante esse período, responsáveis por tornar essa caminhada muito mais fácil e divertida e aos quais eu devo muito do que aprendi. A **todos os alunos de especialização** que passaram pelo Departamento durante esse período.

Às antigas mestrandas, **Elaine Amorim, Livia Roberta e Queila Braga**; e em especial à **Helena Romanos, Marina Siqueira, Nashalie Alencar, Tacíria Bezerra**, com quem pude compartilhar bons momentos.

Às amigas de mestrado **Daniele Cassol**, **Paula Pires**, **Raquel Carvalho** e **Roberta Jorge**, que são meninas inteligentes, talentosas, dedicadas, sempre dispostas a ajudar, parceiras; que tanto me deram apoio e auxílio durante esse período e com as quais passei momentos incríveis.

Aos queridos amigos da minha turma de mestrado, que permitiram que essa caminhada fosse mais leve e divertida e que foram amparo nos momentos de angústia e dificuldade. À **Andrea Laudaes Marques**, por sua calma e paciência, por ser amiga e alegre, por ter sempre uma palavra de conforto e por sempre estar disposta a ajudar. À **Fernanda Mafei Felix da Silva**, por sua alegria e descontração, pelo jeito brincalhão e pelas palavras de conforto e amizade. Ao **Káiron Ribeiro Dias**, pela sua seriedade, calma e tranquilidade e pelo jeito simples e sereno. E à querida **Paula Moraes Lima**, por ser dupla no mestrado e na vida, por ter se tornado grande amiga e parceira, por sempre me ouvir e apoiar, por ser confidente e conselheira, por me ensinar a ser mais paciente e tranquila, por ter aguentado minhas manias e maluquices, por ter sido ombro amigo e esteio e por ter me ajudado imensamente durante essa trajetória.

RESUMO

LETIERI, Aline dos Santos. **AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DE IMUNOGLOBULINA A SECRETÓRIA EM CRIANÇAS COM CÁRIE APÓS TRATAMENTO RESTAURADOR.** Rio de Janeiro, 2016. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A saliva atua diretamente na modulação da ocorrência e progressão da cárie dentária; entretanto a relação entre os níveis de alguns de seus componentes e a doença ainda permanece controversa. Logo, o objetivo do presente estudo foi avaliar os níveis salivares da imunoglobulina A secretória (IgA-s) em pacientes com cárie de acometimento precoce (GC) e livres de cárie (GLC), e verificar esses níveis em um período de acompanhamento após tratamento restaurador no GC. Foram selecionadas crianças sistemicamente saudáveis em período de dentição decídua completa, usando-se os seguintes critérios de exclusão: uso de antibióticos sistêmicos nos 3 meses anteriores, realização de tratamento odontológico restaurador prévio, uso de aparelhos ortodônticos, presença de dentes com necessidade de tratamento pulpar ou exodontia, sangramento gengival espontâneo ou lesão bucal. Os participantes foram alocados em dois grupos: GC (n = 23), com lesões cavitadas em dentina (ceo-s > 0); e GLC (n = 23), com ausência de histórico de doença (ceo-s = 0), inclusive sem presença de mancha branca. Foram obtidas amostras de 1 mL de saliva total não estimulada e o tempo requerido foi registrado para calcular o fluxo salivar. Foi realizada quantificação de proteínas totais, IgA-s, *Lactobacillus sp* e *Streptococcus mutans*. Os pacientes do GC receberam tratamento restaurador com resina composta, sendo realizadas coletas de acompanhamento em períodos de 7 dias, 1, 2 e 3 meses pós-tratamento. Observou-se que a média de idade e a distribuição dos gêneros foi similar entre os grupos ($p > 0,05$, teste Mann-Whitney). O fluxo salivar e a concentração de proteínas totais não diferiram entre os grupos nem durante o acompanhamento no GC ($p > 0,05$, testes Mann-Whitney e Wilcoxon). Os níveis de IgA-s foram estatisticamente mais elevados no GC ($46,89 \pm 41,94 \mu\text{g/mL}$) do que no GLC ($25,40 \pm 15,44 \mu\text{g/mL}$) ($p = 0,03$, teste Mann-Whitney). No GC, houve redução da IgA-s durante o acompanhamento, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$, teste Wilcoxon). Foram obtidas amostras de acompanhamento em alguns participantes do GLC, aonde foram observados níveis similares de IgA-s ($p > 0,05$, teste Wilcoxon). A concentração de *Lactobacillus sp* foi estatisticamente menor no GLC ($p < 0,01$, teste Mann-Whitney), havendo redução durante o acompanhamento no GC ($p < 0,01$, teste Wilcoxon). Houve grande variação interindividual nos níveis de *Streptococcus mutans*; entretanto, no acompanhamento no GC observou-se redução apenas nos indivíduos que apresentaram diminuição da concentração de IgA-s. Diante do exposto, conclui-se que crianças com cárie de acometimento precoce apresentam níveis mais elevados de IgA-s do que as livres de cárie. Além disso, verificou-se que a redução da IgA-s no período de acompanhamento pós-tratamento no grupo com cárie esteve associada à diminuição dos níveis de *Streptococcus mutans*.

Palavras Chave: Cárie Dentária; Saliva; Imunoglobulina A; Pré-Escolar; *Streptococcus mutans*; *Lactobacillus*

ABSTRACT

LETIERI, Aline dos Santos. **LONGITUDINAL EVALUATION OF SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A IN CHILDREN WITH CARIES AFTER RESTORATIVE TREATMENT.** Rio de Janeiro, 2016. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Saliva acts directly modulating the occurrence and progression of dental caries; however, the relationship between the levels of some components and the disease remains controversial. Therefore, the aim of this study was to evaluate the salivary levels of secretory immunoglobulin A (s-IgA) in children with early childhood caries (ECC) and caries-free (CF), and verify these levels in a follow-up period after restorative treatment in ECC participants. It were selected systemic health children in complete primary dentition period, with the following exclusion criteria: use of systemic antibiotics in the previous three months, previous restorative dental treatment, use of any orthodontic appliance, presence of tooth with need of pulp treatment or extraction, spontaneous gingival bleeding or oral lesion. The participants were divided into two groups: ECCG (n = 23), with cavitated lesions in dentin (dmf-s > 0); and CFG (n = 23), with no history of dental caries (dmf-s = 0), including without any whit spot. Samples of 1 mL of unstimulated whole saliva were obtained and the required time was recorded to calculate the salivary flow rate. It was quantified the total protein, s-IgA, *Lactobacillus sp* and *Streptococcus mutans*. Participants from ECCG received restorative treatment with composite resin, being conducted follow-up collections in 7 days, 1, 2 and 3 months after the treatment. It was observed that mean age and gender distribution were similar in both groups (p > 0.05, Mann-Whitney test). The flow rate and total protein concentration did not differ between groups or between follow-up samples in ECCG (p > 0.05, Mann-Whitney and Wilcoxon tests). It was found that the s-IgA levels were significantly higher in ECCG (46.89 ± 41.94 µg/mL) than in CFG (25.40 ± 15.44 µg/mL) (p = 0.03, Mann-Whitney test). In ECCG, s-IgA levels decreased during the follow-up, but it was not statistically significant (p > 0.05, Wilcoxon test). Follow-up samples from some patients of CFG were obtained and was verified similar levels of s-IgA (p > 0.05, Wilcoxon test). The concentration of *Lactobacillus sp* was statistically lower in CFG (p < 0.01, Mann-Whitney test), with a reduction during follow-up in the ECCG (p < 0.01, Wilcoxon test). There were wide interindividual variation in salivary levels of *Streptococcus mutans*; however, it was observed a reduction during follow-up only in ECC participants that showed a decrease in the concentrations of s-IgA. Thus, it is concluded that early childhood caries children have higher levels of s-IgA than caries-free. Furthermore, it was found that the reduction of s-IgA during follow-up in early childhood caries group was associated with the decrease of *Streptococcus mutans* levels.

Key words: Dental Caries; Saliva; Immunoglobulin A; Child, Pre-school; *Streptococcus mutans*; *Lactobacillus*

LISTA DE TABELAS

Artigo

Table 1. Children's demographic data, localization of decayed surfaces, dietary habits, and hygiene background.....	48
Table 2: <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Lactobacillus sp</i> and flow rate of ECC and CF children before and after restorative treatment.....	50
Table 3: Salivary s-IgA and total protein from ECC and CF children before and after restorative treatment.	51

LISTA DE FIGURAS

Artigo

Figure 1: *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus sp* (CFU/mL in Log¹⁰ scale) from ECC and CF children at baseline and 7 days, 1 month, 2 months and 3 months follow-up after restorative dental treatment..... 52

Figure 2: Individual representation of ECC patients with a pattern of reduction in s-IgA values in follow-up period (A) and with aleatory levels (B) and its salivary concentrations of *Streptococcus mutans* (C and D) and *Lactobacillus sp* (E and F). 53

LISTA DE ABREVIATURAS

ceo-d	Índice cariado perdido obturado por dente
ceo-s	Índice cariado perdido obturado por superfície
<i>g</i>	Força gravitacional
GC	Grupo com cárie de acometimento precoce
GLC	Grupo livre de cárie
IgA	Imunoglobulina A
IgA-s	Imunoglobulina A secretória
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetros
°C	Grau Celsius
p	p-valor
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
µg	Micrograma
µL	Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}$	graus
$=$	igual
\geq	maior ou igual
$>$	maior que
$<$	menor que
$-$	menos
$\%$	porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivos específicos	24
3	DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	25
3.1	Desenho do estudo	25
3.2	Aspectos éticos	25
3.3	Seleção da amostra	25
3.4	Avaliação dos hábitos de higiene bucal e dieta.....	26
3.5	Coleta de saliva.....	27
3.6	Tratamento odontológico.....	27
3.7	Análises microbiológicas	28
3.8	Quantificação de proteínas totais	28
3.9	Quantificação da IgA-s	29
3.10	Análise estatística	30
4	DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA	32
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÕES	60
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
8	APÊNDICES	66
8.1	Apêndice 1: Termo de Assentimento Livre e Esclarecido	66
8.2	Apêndice 2: Ficha de exame dentário	69
8.3	Apêndice 3: Anamnese	70
8.4	Apêndice 4: Ficha dos resultados das análises laboratoriais	72
9	ANEXOS	73
9.1	Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UFRJ)	73

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença complexa e de caráter multifatorial, na qual estão envolvidos fatores genéticos, ambientais e comportamentais (Fejerskov, 2004). Sua evolução é capaz de causar grande destruição dentária, podendo resultar em complicações locais, sistêmicas, psicológicas e sociais. Essas consequências podem afetar a curto e longo prazo a qualidade de vida dos pacientes e seus familiares (Martins-Junior et al., 2013; Clementino et al., 2015). Devido ao fenômeno de polarização da doença, é ainda considerada um problema de saúde pública em algumas populações, sendo uma das doenças crônicas mais comuns na infância (Misra et al., 2007).

As crianças, especialmente as mais jovens, constituem uma população ainda muito afetada pela doença. A denominação cárie de acometimento precoce é empregada quando há a presença de uma ou mais superfícies cariadas (cavidades ou não), perdidas ou obturadas em qualquer dente decíduo de crianças de até 71 meses de idade (AAPD, 2008). Dados dos Estados Unidos mostram que a cárie de acometimento precoce continua a apresentar alta prevalência, especialmente acometendo os dentes anteriores superiores. Apesar disso, vem sendo constatada uma discreta melhora na condição bucal desse seguimento da população, aonde vem sendo observadas mais superfícies tratadas do que cariadas (Dye, Hsu e Afful, 2015). No Brasil, foi verificada uma redução de 13,9% no índice ceo-d aos 5 anos de idade, entre os anos de 2003 e 2010. Entretanto, a proporção de dentes cariados se manteve em 80% nesse grupo (Ministério da Saúde, 2012), demonstrando que ainda existe uma alta demanda por tratamento odontológico para as crianças dessa faixa etária no país.

Dentre as muitas variáveis associadas ao maior risco à ocorrência e progressão da cárie, destacam-se os fatores socioeconômicos, microbiota, dieta, resposta do hospedeiro, estrutura dental, utilização de fluoretos e alterações nos componentes salivares, podendo causar o desequilíbrio bioquímico da cavidade bucal (Valaitis et al., 2000; Baginska e Stokowska,

2006; Schroth et al., 2007; Camacho et al., 2009; Svec et al., 2009). Apesar da existência de amplas investigações sobre esses fatores de risco na literatura, ainda existem falhas e carências em resultados que possibilitem o planejamento e realização de intervenções preventivas e tratamentos conservadores de ampla abrangência (Touger-Deckere e Van Louveren, 2003). Existem ainda lacunas de conhecimento acerca de intervenções de caráter microbiológico, abordagens remineralizantes e reparadoras na gestão da cárie de acometimento precoce (Garcia et al., 2015). Desse modo, reforça-se a importância de estudos e abordagens sobre métodos preventivos, que devem ser iniciados de modo precoce e mantidos durante toda a infância e adolescência (Pereira et al., 2010).

No processo da doença, o biofilme dental compreende um microecossistema de microrganismos com características fisiológicas que favorecem sua colonização nas superfícies dentárias, através de propriedades como adesão e resistência a baixos níveis de pH (Gudino et al., 2007). Dentre a vasta microbiota relacionada à doença, dois microrganismos que estão reconhecidamente envolvidos nesse processo são os *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus sp* (Takahashi e Nyvad, 2008).

Os *Streptococcus mutans* são cocos imóveis, organizados em cadeias curtas ou médias, Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não-esporulados. Suas principais propriedades relacionadas à cariogenicidade são: capacidade de colonização primária das superfícies dentárias; produção de ácido lático por meio da fermentação de carboidratos (potencial acidogênico); presença de potencial acidúrico maior que os outros estreptococos e capacidade de sintetizar polissacarídeos insolúveis a partir da sacarose. A presença dessas características, aliadas ao fato de serem frequentemente isolados de lesões de cárie, apontam estes microrganismos como agentes patogênicos envolvidos diretamente no início do processo da cárie dentária (Clarke, 1924; Takahashi e Nyvad, 2008). E, apesar do seu caráter multifatorial, a presença desse microrganismo tem grande importância para o estabelecimento da doença, sendo apontado como um fator de risco fortemente associado à cárie de acometimento precoce (Parisotto et al., 2010).

Os *Lactobacillus sp* são bastonetes Gram-positivos, que raramente apresentam mobilidade, anaeróbios facultativos, não-esporulados. Foram os primeiros microrganismos considerados cariogênicos, porém, posteriormente, descobriu-se que eles não estão relacionados ao início, e sim com a progressão do processo carioso, uma vez que são selecionados pela acidez do microambiente, que é consequência da doença já iniciada. Estão relacionados com alta e frequente ingestão de carboidratos, podendo ser utilizados para avaliação de risco e progressão de cárie (Mattos-Graner et al., 2000; Santos et al., 2002; Takahashi e Nyvad, 2011).

Outro componente envolvido diretamente com a dinâmica do processo carioso é a saliva, uma vez que exerce importante papel na homeostase da cavidade bucal. Ela é composta de 99,5% de água e 0,25% de matéria orgânica, principalmente proteínas (Dawes et al., 2015). As mudanças salivares, em geral, podem modular as alterações nos tecidos dentais. A saliva interfere no processo da doença através de propriedades como fluxo salivar, capacidade tampão e de lavagem, formação da película adquirida e presença de anticorpos salivares (Thaweboon et al., 2008; Horst et al., 2011; Bagherian e Asadikaram, 2012).

Os anticorpos, importantes componentes da resposta imune específica, estão presentes tanto na saliva como em outras secreções corporais, como soro, leite e lágrimas, e fazem parte de um grupo de proteínas solúveis, chamadas imunoglobulinas. Diferentes tipos de imunoglobulinas são encontrados na saliva (IgG, IgM, IgE, IgD), sendo a imunoglobulina A secretória (IgA-s) o tipo predominante (Rúpolo et al., 1998).

A imunoglobulina A é considerada um componente da primeira linha de defesa imunológica, produzida através da estimulação direta das células de defesa, como os linfócitos B, por antígenos locais. Ela é carregada por transporte ativo até a saliva através da ligação com células secretoras presentes nas glândulas salivares, recebendo a denominação de IgA-s (Mostov, 1994). Foi demonstrado que a secreção de IgA-s é aumentada por estimulação nervosa das glândulas salivares (Proctor et al., 2000) e que suas concentrações na saliva variam de acordo com a velocidade de transporte,

podendo haver diminuição nos casos de estímulo do fluxo salivar (Kugler, Hess e Haake, 1992). Sua principal atuação biológica é na proteção das superfícies mucosas contra invasão por vírus e bactérias, além de ser responsável pela imunidade adquirida contra os antígenos bucais, estando relacionada à memória imunológica do hospedeiro (Rúpolo, et al., 1998; Dawes et al., 2015). Além disso, a IgA-s pode atuar sinergicamente com outros componentes salivares, como lactoferrina, peroxidase e lisozima, que possuem atividade antimicrobiana, neutralizando vírus e toxinas e inativando enzimas associadas a colonização pelo *Streptococcus mutans* (Law et al., 2007).

Diversos trabalhos investigaram a relação entre os níveis salivares de IgA-s e a cárie dentária, porém apresentando resultados contraditórios. Foram observados níveis mais elevados de IgA-s em indivíduos livres de cárie (Chawda et al., 2011; Chopra et al., 2012), atribuindo-se um papel de proteção a essa imunoglobulina (Lehtonen et al., 1984), acreditando-se que níveis elevados de IgA-s seriam capazes de impedir o início da doença.

Em contrapartida, outros trabalhos encontraram concentrações mais elevadas de IgA-s nos grupos com cárie (Ranadheer et al., 2009) e com cárie de acometimento precoce (Farias e Bezerra, 2003; Thaweboon et al., 2008; Bagherian e Asadikaram, 2012). Esse achado corrobora com os resultados de uma revisão sistemática e metanálise, na qual constatou-se que indivíduos com cárie apresentavam níveis de IgA-s mais elevados comparado aos livres de cárie (Fidalgo et al., 2014). Foi constatada também relação direta entre níveis mais elevados de IgA-s e o número de lesões ou superfícies cariadas (Kirtaniya et al., 2009; Chopra et al., 2012), o que fez essa imunoglobulina ser considerada um marcador do histórico de ocorrência da doença (Ranadheer et al., 2011). Nesses estudos, considerou-se que os níveis elevados desse anticorpo na saliva de indivíduos com cárie eram uma consequência da resposta do sistema imunológico dos hospedeiros ao processo cariioso já instalado.

Devido às grandes diferenças metodológicas entre os estudos e os dados contraditórios obtidos, os resultados nessa área tornam-se inconclusivos. Além disso, há carência de estudos longitudinais, que possam

demonstrar o comportamento dos níveis de IgA-s após a realização do tratamento odontológico restaurador, com o objetivo de entender o mecanismo de atuação desse anticorpo em relação à doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Comparar os níveis de IgA-s salivar entre crianças com cárie de acometimento precoce e livres de cárie, e verificar sua concentração em um período de acompanhamento após o tratamento restaurador.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar os níveis salivares de IgA-s, proteína total, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus sp* e o fluxo salivar entre os grupos com cárie de acometimento precoce e livre de cárie; e entre o momento inicial e diferentes períodos de acompanhamento após tratamento restaurador no grupo com cárie de acometimento precoce.
- Relacionar os níveis de IgA-s e microbiota cariogênica do grupo com cárie de acometimento precoce no períodos estudados.

3 DELINEAMENTO DA PESQUISA

3.1 Desenho do estudo

O presente trabalho foi realizado através de um estudo clínico longitudinal controlado. A pesquisa foi conduzida na Clínica do Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (FO/UFRJ), no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Odontologia (LMPO) da FO/UFRJ e no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas – Centro de Ciências da Saúde - UFRJ.

3.2 Aspectos éticos

O projeto do estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UFRJ), sob o parecer de número 934.503 (**Anexo 1**), antes do início da sua execução. Todos os participantes e seus responsáveis legais receberam informações escritas e verbais sobre objetivos, riscos, direito a acessibilidade e confidencialidade dos dados e possibilidade de negar-se ou desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem acarretar em nenhum prejuízo a eles. A inclusão no estudo se deu após consentimento voluntário verbal e assinatura do termo de assentimento livre e esclarecido (**Apêndice 1**), pelas crianças, quando possível, e seus responsáveis, que receberam cópias assinadas desse documento.

3.3 Seleção da amostra

Foram selecionados pacientes sistemicamente saudáveis, atendidos na Triagem e na Clínica de Bebês, no setor de Odontopediatria do Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da FO/UFRJ, com idade entre 24 e 71 meses

e em período de dentição decídua completa. Foi realizada uma triagem inicial desses pacientes, por um pesquisador treinado e calibrado, em equipo odontológico, com uso de luz artificial (foco), espelho bucal e seguindo todas as normas de controle de segurança, incluindo utilização do equipamento de proteção individual. Foram empregados os seguintes critérios de exclusão: 1) presença de doença sistêmica, segundo relato dos responsáveis; 2) uso de antibiótico sistêmico nos três meses prévios; 3) início de erupção de qualquer elemento dentário permanente; 4) presença de sangramento gengival espontâneo ou qualquer lesão bucal; 5) pacientes previamente submetidos a tratamento odontológico restaurador ou exodontias; 6) presença de qualquer dente com necessidade de tratamento pulpar ou exodontia. Nos casos de lesões cáries profundas, aonde haviam dúvidas sobre possível envolvimento pulpar, foram realizadas radiografias interproximais, através do uso de posicionador radiográfico.

Foi selecionada uma amostra de conveniência e os participantes foram divididos em dois grupos pela presença ou ausência de cárie, utilizando-se o índice cariado perdido obturado por superfície (ceo-s) (**Apêndice 2**). O grupo com cárie de acometimento precoce (GC) foi formado por crianças que apresentavam pelo menos uma superfície cavitada (ceo-s > 0). O grupo livre de cárie (GLC) foi composto por crianças sem histórico de doença (ceo-s = 0), inclusive considerando-se a ausência de manchas brancas ativas ou inativas como critério para inclusão nesse grupo.

3.4 Avaliação dos hábitos de higiene bucal e dieta

Foi feito preenchimento de uma ficha de anamnese direcionada com os responsáveis, na qual foi avaliada a história médica (presença de doenças; uso de medicamentos), os hábitos de dieta (consumo atual de açúcar e amamentação atual e pregressa) e de higiene bucal (escovação dentária) dos participantes (**Apêndice 3**).

3.5 Coleta de saliva

Foi realizada coleta de amostras de 1 mL de saliva total não estimulada da região do assoalho bucal dos participantes, com uso de uma pipeta automática universal. As crianças permaneciam sentadas na cadeira odontológica, em uma posição de 90° em relação ao solo e deviam estar no mínimo a uma hora sem se alimentar nem realizar escovação dentária. Todas as coletas foram realizadas no período da manhã, entre 08:00 e 11:00 horas, e o tempo dispendido para sua obtenção foi registrado, a fim de calcular a taxa de fluxo salivar, que foi registrada em mL/min (Fidalgo et al., 2015) **(Apêndice 4)**. As coletas foram realizadas em um momento inicial, nos dois grupos, e em períodos de acompanhamento pós-tratamento (7 dias, 1, 2 e 3 meses) no GC e em alguns participantes do GLC. As amostras eram levadas até o laboratório LMPO/UFRJ em isopor com gelo, aonde foram posteriormente avaliadas. Uma alíquota de 200 µL era retirada para avaliação imediata da microbiota e o restante da amostra era congelado a -80°C até o momento das demais análises.

3.6 Tratamento odontológico

Todos os participantes receberam um kit odontológico, com escova de dentes infantil, dentífrico fluoretado e fio dental, no início do estudo. Os responsáveis e as crianças receberam instruções de higiene bucal (técnica de escovação transversal) e de dieta (consumo racional de açúcar) e os pacientes eram submetidos a profilaxia profissional (pasta profilática e escova de rotação) e aplicação tópica de flúor em gel na consulta inicial e a cada reavaliação.

Os pacientes do GC foram submetidos a tratamento odontológico restaurador, realizado com anestesia local (cloridrato de lidocaína a 2% com epinefrina 1:100.000), isolamento absoluto (grampo metálico e lençol de borracha) e resina composta fotopolimerizável (TPH, Dentispaly®), com utilização de sistema adesivo de 2 passos, de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. Todos os participantes desse grupo foram

submetidos a avaliações de acompanhamento, nos períodos de 7 dias, 1 mês, 2 meses e 3 meses após o término do tratamento restaurador, nas quais foram realizadas coletas de saliva e avaliação clínica e de hábitos de higiene e dieta, conforme descrito anteriormente. Em alguns pacientes do GLC também foram realizadas avaliações de acompanhamento, para verificar a variabilidade intraindividual, seguindo os mesmos intervalos de tempo utilizados para o outro grupo, a contar da data da coleta inicial. Os participantes que, durante o período de acompanhamento, apresentaram reincidência de cárie, perda total ou parcial das restaurações ou algum dos fatores de exclusão adotados na seleção inicial, foram removidos do estudo.

3.7 Análises microbiológicas

Foi realizada a diluição de 50µL de saliva pura de cada amostra em tubos estéreis contendo NaCl a 0.85%, obtendo-se concentrações finais de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Essas diluições foram plaqueadas em duplicata (50µL em cada placa), utilizando alças de drigalsky, em 10 mL de meio ágar Mitis salivarius acrescido de bacitracina (Difco, Detroit, USA) para contagem de *Streptococcus mutans*, e meio ágar Rogosa (Difco, Detroit, USA), para quantificação de *Lactobacillus sp.* As placas foram incubadas em microaerofilia a 37°C por 48 horas e, após esse período, foram retiradas e foi feita a contagem visual das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), expressas em UFC/mL (**Apêndice 4**).

3.8 Quantificação de proteínas totais

As amostras salivares foram inicialmente descongeladas, agitadas em vórtex e centrifugadas a 1500 g por 15 minutos, sendo analisadas em duplicata. Foram adicionados 10 µL de saliva com 200 µL de Azul de Coomassie, e as diferenças colorimétricas geradas pela ligação das proteínas salivares com esse corante foram verificadas através da leitura da densidade óptica da placa a 630 nm em um espectrofotômetro (SpectraMax Paradigm,

Molecular Devices®). Foi utilizado o método de Bradford (Bradford, 1976), que usa a albumina sérica bovina para obtenção de uma curva de valores padrão, gerando uma equação da reta na qual foram incluídos os valores pesquisados, obtendo-se assim os resultados, expressos em $\mu\text{g/mL}$ (**Apêndice 4**).

3.9 Quantificação da IgA-s

As amostras salivares foram descongeladas, agitadas em vórtex e centrifugadas a 1500 *g* por 15 minutos. A concentração de IgA-s foi obtida através de um ensaio imunoenzimático de um kit comercial (Salimetrics®, Science Pro), seguindo as recomendações indicadas pelo fabricante.

Todos os componentes do kit foram trazidos à temperatura ambiente antes do início das análises. Foi utilizado um volume de 25 μL de cada amostra, diluída em 100 μL de diluente em tubo falcon. Cada tubo foi incubado por 90 minutos em temperatura ambiente após a adição de 50 μL de conjugado. Depois disso, foi transferido 50 μL de cada tubo para os poços de uma placa de microtitulação, que foi incubada por 90 minutos em contínua agitação, a 400 rpm, em uma mesa agitadora microprocessada (Quimis®). Cada poço foi então lavado com 300 μL de uma solução tampão e recebeu 50 μL de uma solução de tetrametilbenzidina (TMB), promovendo uma reação química que deixa a solução com uma coloração azul. A placa foi agitada a 500 rpm por 5 minutos e incubada em repouso na ausência de luminosidade por 40 minutos. Depois disso, foram adicionados 50 μL de uma solução de parada disponibilizada no kit, que interrompe a reação química existente e muda a cor das soluções para um tom amarelado. A placa foi mantida em agitação por 3 minutos a 500 rpm e então a densidade óptica foi lida a 450 nm em um espectrofotômetro (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices®). Foi obtida uma curva de valores padrão, através da utilização de soluções controle de concentrações conhecidas, disponibilizadas no kit. Os valores pesquisados foram inseridos na reta para obtenção dos resultados, expressos em $\mu\text{g/mL}$ (**Apêndice 4**).

3.10 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram tabulados e analisados pelo software SPSS 20.0. Foi feita a análise descritiva da amostra, obtendo-se as médias, desvio padrão e porcentagens de distribuição dos seguintes dados: idade, gênero, superfícies cariadas, hábitos de higiene e dieta. Todos os testes estatísticos empregados foram ajustados com 95% de nível de significância.

O teste Shapiro-Wilk foi aplicado a fim de avaliar a distribuição dos dados e determinar os tipos de testes (paramétricos ou não paramétricos) a serem utilizados.

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as médias de idade, distribuição dos gêneros, taxa de fluxo salivar e níveis de *Lactobacillus sp*, *Streptococcus mutans*, proteínas totais e IgA-s entre os grupos. Além disso, foi empregado para comparar a distribuição das superfícies cariadas entre os arcos superior e inferior e entre as regiões anterior e posterior, no GC.

O teste ANOVA foi usado para comparar as diferentes localizações das superfícies cariadas entre as faces dentárias acometidas (vestibular, lingual ou palatina, mesial, distal, oclusal ou incisal) no GC.

O teste Qui-Quadrado, foi usado para comparar os resultados acerca dos hábitos de higiene bucal e dieta observados entre os grupos.

O teste Wilcoxon foi usado na comparação da taxa de fluxo salivar e níveis de *Lactobacillus sp*, *Streptococcus mutans*, proteínas totais e IgA-s entre os diferentes momentos de coleta no GC.

A fim de realizar uma análise mais detalhada do GC, foi feita uma subdivisão em grupo com baixa presença de cárie (ceo-s < 10) e grupo com alta presença da doença (ceo-s ≥ 10), sendo comparados os níveis de IgA-s através do teste Mann-Whitney. Além disso, foi analisada se a variação dos níveis dessa imunoglobulina durante o período de acompanhamento no GC seguiu ou não um padrão semelhante entre os pacientes. Foram então formados dois outros subgrupos, um com pacientes que tinham valores de IgA-s com distribuição semelhante, e outro com aqueles que apresentaram valores

oscilatórios durante esse período. Foi feita a comparação entre os níveis salivares de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus sp* entre esses dois últimos subgrupos, nos períodos analisados, com o teste Wilcoxon.

4 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

Artigo:

Salivary s-IgA and early childhood caries: follow-up evaluations after restorative treatment

Short title: **Salivary s-IgA and dental caries**

Aline dos Santos Letieri¹

Liana Bastos de Freitas Fernandes²

Fábio Almeida³

Ana Paula Valente³

Tatiana Kelly da Silva Fidalgo⁴

Ivete Pomarico Ribeiro de Souza⁵

¹MSD student, Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

²Visiting Professor, Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

³Associated Professor, Nacional Center for Nuclear Magnetic Ressonance, Medical Biochemistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

⁴Postdoctoral Researcher, Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

⁵Full Professor, Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Correspondence author

Ivete Pomarico Ribeiro de Souza

E-mail: pomarico@gmail.com

Disciplina de Odontopediatria da FO-UFRJ

Caixa Postal: 68066 - Cidade Universitária - CCS

CEP: 21941-971 - Rio de Janeiro – RJ – Brazil

ABSTRACT

Several salivary components are associated with dental caries, but studies about secretory immunoglobulin A (s-IgA) present controversial results. Therefore, the aim of this study was to compare salivary levels of s-IgA in children with early childhood caries and caries-free, and verify in a follow-up period after restorative treatment. It were selected 46 systemically healthy children in complete deciduous dentition period, being allocated in two groups: caries-free group (CFG; dmf-s = 0; n = 23) and early childhood caries group (ECCG; dmf-s > 0; n = 23). Unstimulated whole saliva was obtained at baseline from both groups and during the follow-up periods (7 days, 1, 2 and 3 months) in ECCG. The flow rate, cariogenic microorganisms counting and total protein were assessed. Salivary s-IgA levels were statistically higher in ECCG ($46.89 \pm 41.94 \mu\text{g/mL}$) than in CFG ($25.40 \pm 15.44 \mu\text{g/mL}$) at baseline. No significant differences in s-IgA levels between baseline and follow-up in ECCG was verified. It was observed that patients from ECCG who presented a reduction in s-IgA levels during follow-up, also showed a decrease in concentrations of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus sp* ($p < 0.05$). The flow rate and the total protein did not differed between the groups. The present data demonstrated that salivary levels of s-IgA were higher in ECCG than in CFG. Furthermore, it was verified that the restorative dental treatment did not show significant influence in the s-IgA levels, which were related to the *Streptococcus mutans* levels during follow-up.

Keywords: Saliva; Dental Caries; Immunoglobulin A; Child, Preschool; *Streptococcus mutans*; *Lactobacillus*

INTRODUCTION

Dental caries is one of the most common chronic disease in childhood [Misra *et al.*, 2007]. Although its frequency has decreased over the past decades around the world, there is still a high incidence in specific population groups, such as young children [Dye *et al.*, 2015; Garcia *et al.*, 2015]. Early childhood caries (ECC) is characterized by the occurrence of one or more decayed, missing or filled tooth surfaces due to caries in children up to 71 months [AAPD, 2008].

Saliva plays an important role in modulation of occurrence of dental caries. It is a complex biofluid that presents constituents from innate and acquired immunological response [Lenander-Lumikari and Loimaranta, 2000]. One of these components is the secretory immunoglobulin A (s-IgA), that is considered a specific local acquired defense mechanism in the oral cavity. Among functions, s-IgA is able to neutralizing enzymes, toxins and virus and act in synergy with others innate antibacterial factors, as lysozyme, lactoferrin, salivary peroxidase and mucins [Rúpolo *et al.*, 1998; Marcotte and Lavoie, 1998]. Besides that, it is an antibody mainly related to interfere in microbial adherence to epithelial cells and tooth surfaces [Hajishengallis *et al.*, 1992].

Thereby, some studies have investigated the relationship between salivary levels of s-IgA and dental caries. Some authors found higher levels of s-IgA in saliva of patients with caries [Parisotto *et al.*, 2011; Chopra *et al.*, 2012; Bagherian and Asadikaram, 2012; Priya *et al.*, 2013], while others observed opposite results, with higher levels in caries-free [Kirtaniya *et al.*, 2009; Chawda *et al.*, 2010; Hagh *et al.*, 2013; Pal *et al.*, 2013]. It was observed important methodological differences between the researches, besides the lack of longitudinal evaluations. The present literature not show strong evidence if the elevated levels of this immunoglobulin in saliva act protecting against the cariogenic microorganisms colonization or if it is a result of a host immunological response. Thus, the aim of this study was to investigate the s-IgA levels in whole saliva of caries-free and early childhood caries children and perform a longitudinal evaluation of early childhood caries group in a follow-up period after restorative dental treatment.

MATERIAL AND METHODS

Ethical Aspects

The present study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was submitted and approved by the local Ethical Committee in Research (Approval protocol #242-14). Participants were only included if them and their legal guardians agreed verbally and written to participate in the research.

Subjects

For this longitudinal study, it were evaluated children in the complete deciduous dentition period, between 24 and 71 months of age. The exclusion criteria comprised the use of any systemic antibiotics in the prior 3 months, presence of systemic disease, eruption of any permanent tooth, spontaneous gingival bleeding, oral lesions, patients who had already undergone restorative dental treatment or were using any orthodontic appliance; who had teeth with need of pulp treatment or extraction. In cases of doubts about depth of carious lesions were performed bitewings radiographs.

The selected subjects underwent an initial dental screening in a dental chair, with focusable flashlight and mouth mirror, following all cross-infection control measures. They were allocated in two groups, according the presence or absence of dental caries, that was assessed by two calibrated examiners (interexaminer reliability, Kappa = 0.87) using the decay-missing-filled surface index (dmf-s) [WHO, 1998]. The early childhood caries group (ECCG; n = 23) included children that had at least one decayed surface (dmf-s > 0); and caries-free group (CFG; n = 23) was formed by children that never had any history of dental caries (dmf-s = 0), and who did not have any active or inactive white spot.

Saliva Collection and Restorative Dental Treatment

Salivary samples were collected from all participants in both groups, at a baseline. An amount of 1 mL of unstimulated whole saliva was obtained from the floor of the mouth using an automatic pipette and was placed into a sterile plastic universal tube, and the required time was set for salivary flow rate calculation [Fidalgo et al., 2015], expressed in mL/min. All samples were taken during morning (08:00h – 11:00h), at least 1 hour after patients have eaten, drunk or brushed their teeth, and were transferred on ice to a microbiological laboratory.

All participants receive oral hygiene kits (toothbrush, fluoride toothpaste and dental floss) at the initial appointment, and they and their legal guardians were instructed about oral hygiene and health dietary habits in all evaluation moments. Patients of ECCG received restorative dental treatment with composite resin, according to the manufacturer's instruction, and were performed more four saliva sample collections, in periods of 7 days, 1 month, 2 months and 3 months after dental treatment, at the same way as described above. Subjects that began using antibiotics, that need pulp treatments or dental extractions and that developed any systemic or oral disorder during the follow-up period were excluded from the sample.

Salivary Microbiological Analysis

Within a period of 2 hours after collecting, the saliva samples were diluted in sterilized 0.85% NaCl to 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} , and 50 μ L of each dilution was plated in duplicate on 10 mL of Mitis salivarius agar (Difco, Detroit, USA) with bacitracin for quantification of *Streptococcus mutans* and Rogosa (Difco, Detroit, USA) for *Lactobacillus sp.* The plates were incubated in candle jars at 37 °C and, after 48 hours, the colonies of microorganisms were counted. The results were expressed as colony-forming units per milliliter (CFU/mL). The remaining samples were stored at -80 °C until immunological analysis.

Quantification of s-IgA

Saliva samples were analyzed using an indirect competitive immunoassay commercial kit for the quantitative measurement of s-IgA (SALIMETRICS, Science Pro), following the manufacturer's recommendations.

All kit components and saliva samples were brought at room temperature before use. The samples were completely vortexed and centrifuged at 1500 g for 15 minutes. Then, 25 μ L of each sample was diluted in 100 μ L of s-IgA diluent in appropriated tubes and were incubated with 50 μ L of diluted antibody-enzyme conjugate, for 90 minutes at room temperature. After this, 50 μ L from each tube was added to the microtiter plate, being subsequently incubated at room temperature with continuous mixing at 400 rpm in a microprocessor shaker table (Quimis[®]) for 90 minutes. Then, each well was washed with diluted wash buffer and 50 μ L of TMB solution was added. The plate was mixed for 5 minutes at 500 rpm and incubated in the dark at room temperature for 40 minutes. After that, 50 μ L of a stop solution was added in wells, the plate was mixed for more 3 minutes at 500 rpm, and the optical density was read in a plate reader (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices[®]) at 450 nm. A standard curve was obtained and salivary s-IgA were calculated and expressed in μ g/mL.

Quantification of Total Protein

Total protein concentration in salivary samples was determined using bovine serum albumin for calibration, following the Bradford method [Bradford, 1976]. The samples were analyzed in duplicate with the use of Coomassie Brilliant Blue G-250, that binds to salivary proteins. The optical density was read at 630 nm on a spectrophotometer (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices[®]). The results were expressed in μ g/mL.

Statistical Analysis

The data were tabulated and analyzed using SPSS 20.0 (SPSS Inc, IL, USA). Means, standard errors and percentages of descriptive data of the sample (age, gender, decayed surfaces, diet and oral hygiene habits) were obtained. The Shapiro–Wilk normality test was applied in order to verify the

distribution of the data. All used tests were adjusted with 5% of significance level.

The Mann–Whitney test were used to compare mean ages, gender frequency, flow rate and salivary levels of *Lactobacillus sp*, *Streptococcus mutans*, total protein and s-IgA between the groups and to compare the distribution of decayed surfaces between dental arches (superior and inferior) and regions (anterior and posterior) in ECCG. The ANOVA test was used to compare the different localizations of decayed surfaces (buccal, lingual, mesial, distal incisal or occlusal) in ECCG. The comparison between diet and oral hygiene habits of both groups was performed with the Chi-Square Test. The flow rate and salivary levels of the microorganisms, total protein and s-IgA between baseline and each follow-up sample (7 days, 1 month, 2 months and 3 months) in ECCG were compared with the Wilcoxon test.

In order to make a more detailed analysis of s-IgA data in ECCG, was made a subdivision according the severity of the disease, in low dmfs (dmfs < 10) and high dmfs group (dmfs \geq 10). The mean levels of s-IgA of these subgroups at baseline were compared using the Mann–Whitney test. Furthermore, it was observed if the ECC participants presented or not a pattern of distribution of s-IgA levels in follow-up period. It was done another subdivision, in one group with participants that showed a similar behavior of this levels and another one, with subjects that presented aleatory levels during this period. These subgroups were analyzed separately and the *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus sp* levels in all evaluation moments were compared with the Wilcoxon test.

RESULTS

The ECCG was initially composed by 23 children. During the follow-up period occurred some drop-outs, remain 22 participants in 7 days and 1 month evaluations; 21 subjects in 2 months, and 12 children in the 3 months appointment.

The mean age and gender were similar between CFG and ECCG ($p >$

0.05). The mean dmfs in ECCG was 10.2 ± 8.1 , and the decayed surfaces were more present in superior arch ($p < 0.01$). Reported daily use of fluoride toothpaste, sugar consumption and nocturnal nursing bottle did not differ statistically between the groups ($p > 0.05$) (**Table 1**).

The level of *Lactobacillus sp* were higher in the ECCG than in CFG at baseline ($p < 0.001$). It was observed a significantly decrease between baseline and all follow-up samples in ECCG ($p < 0.001$); however, the mean level of 3 months follow-up in this group continued statistic higher than the baseline in CFG ($p = 0.04$). The *Streptococcus mutans* counting was similar between both groups at baseline ($p > 0.05$). In ECCG, it were observed a significant reduction from baseline and all follow-up samples ($p < 0.05$), and were found similar levels between 3 months follow-up in this group and baseline at CFG ($p > 0.05$) (**Table 2**). **Figure 1** shows in \log^{10} scale the levels of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus sp* in each period.

A similar flow rate was observed between both groups at baseline ($p > 0.05$) and also between all evaluations in ECCG ($p > 0.05$) (**Table 2**). The salivary concentration of total protein at baseline did not differed in saliva samples from the groups ($p > 0.05$), but was observed a significant reduction between baseline and 7 days follow-up in ECCG ($p < 0.001$). No differences were observed among the baseline and the other follow-up samples from ECC children ($p > 0.05$) (**Table 3**).

It was observed that s-IgA levels in saliva from ECCG were statistically higher than in CFG ($p = 0.03$) (**Table 3**). The subgroup of ECC that presented high dmfs showed higher levels of s-IgA ($55.20 \pm 59.86 \mu\text{g/mL}$) than in the low dmfs group ($40.65 \pm 22.20 \mu\text{g/mL}$), but this difference was not statistically significant ($p = 0.86$). Regarding the follow-up after restorative treatment in ECCG, it was observed a slight decrease in mean levels of s-IgA over the time, from baseline until 2 months evaluation ($p > 0.05$) (**Table 3**). In participants from CFG that were submitted to follow-up collections, were observed similar values in flow rate, total protein and s-IgA between baseline and all follow-up samples ($p > 0.05$).

It was found a wide interindividual variation in salivary s-IgA between the participants. The individual range of s-IgA levels of 16 representative patients from ECC group, from baseline until the 3 months follow-up, was demonstrated in **Figure 2 (A e B)**. It was observed that some children with ECC showed a reduction in the s-IgA levels after 7 days ($p = 0.04$), 1 month ($p = 0.02$), 2 months ($p = 0.02$) and 3 months ($p = 0.03$) after dental treatment (**Figure 2A**). This subgroup of children exhibited increased levels of oral microorganisms at baseline and a decreasing of *Streptococcus mutans* counting during the follow-up period (**Figure 2C**). Otherwise, subjects that did not clear reduced the s-IgA levels in the follow-up period ($p > 0.05$) (**Figure 2B**), did not show a reduction in *Streptococcus mutans* levels (**Figure 2D**). Both subgroups showed reduction in *Lactobacillus sp* levels after restorative treatment (**Figure 2E and F**).

DISCUSSION

The present research shows that concentration of s-IgA in saliva was higher in ECC than in CF children. This data corroborates with what was presented by several other studies, that found higher levels of s-IgA in saliva of individuals with dental caries than in caries-free [Sikorskavet et al., 2002; Farias and Bezerra, 2003; Thaweboon et al., 2008; Parisotto et al., 2011; Ranadheer et al., 2011; Bagherian and Asadikaram, 2012; Chopra et al., 2012; Priya et al., 2013]. These results lead to consider that this immunoglobulin act as a salivary indicator for the occurrence of dental caries [Ranadheer et al., 2011]. Thus, it is believe that the elevated levels of s-IgA in saliva are the result of stimulation of the local immune system by carious process already installed. It is supported by the fact that the secretion of the salivary IgA is induced by the direct contact of oral antigens, for example the cariogenic microorganisms, on lymphoid tissue present in the ducts of the salivary glands [Marcotte and Lavoie, 1998].

Our results are also in agreement with a systematic review and meta-analysis, which concluded that there is scientific evidence that the s-IgA levels were increased in subjects with dental caries. Moreover, this review report the lack of longitudinal studies, in order to verify possible changes in the local immune response of patients after dental treatment [Fidalgo et al., 2014], which was proposed by the present study. Besides that, it was pointed out large

methodological differences between the researches [Fidalgo et al., 2014], which could explain studies with contradictory results, that found higher levels of salivary s-IgA in CF individuals [Kirtaniya et al., 2009; Chawda et al., 2010; Hagh et al., 2013; Pal et al., 2013]. This other current believes that these higher levels of this antibody in saliva would act preventing the occurrence of the disease process, having a protective role against caries [Lehtonen et al., 1984].

Regarding the methodological variations between sample selection among the studies, the age and the dentition stage of the participants are important variables. There are questions about the oscillations that occur in the salivary s-IgA levels during different stages of life, caused by changes and maturation of the immune system [Marcotte and Lavoie, 1998]. Very young children tend to have lower levels of this antibody, which shows a gradual increase over the years and might influence the establishment of the oral microbiota [Childers et al, 2003; Nogueira et al., 2012]. Besides that, changes in the concentration of s-IgA could be related with the eruption of new teeth, as in mixed dentition period, because there are local inflammatory changes [Parisotto et al., 2011]. In order to avoid this bias, in the present study it were selected only children in primary dentition period and no significant differences were observed between mean ages and gender among groups.

It is known that the ECC is a complex and multifactorial disease. There are several risk factors involved in its pathogenesis, such as the environmental, sociocultural and behaviors risks [Azevedo et al., 2005; Losso et al., 2009; Nobile et al., 2014; Peltzer and Mongkolchati, 2015]. One factor that tends to be strongly associated with the occurrence of ECC is the dietary habits, for example bottle feeding, especially during the night. However, in our results, none of the variables investigated related to children's habits differ between the groups, which may have been due to the small sample size used, that was one of the limitations of the present study.

The present study shows a significant higher prevalence of decayed surfaces in the superior arch. This data corroborates with the literature, which demonstrated that is a specific pattern of occurrence of the early childhood caries, mainly affecting the primary maxillary incisors in young children. It is

believed that this is related to the causal factors, such as the use of bottle for a prolonged period, and the location of these teeth in the dental arch. [Shelton et al., 1977; Milnes, 1996, Valaitis et al., 2000].

Another important methodological question that differ between the researches is the index used to caries evaluation. Most studies use the index dmf-t/DMF-T [Farias and Bezerra, 2003; Thaweboon et al., 2008; Kirtaniya et al., 2009; Chawda et al., 2010; Parisotto et al., 2011; Ranadheer et al., 2011; Bagherian e Asadikaram, 2012; Chopra et al., 2012; Priya et al., 2013; Pal et al., 2013], in which the tooth is the unit of measure considered. We used the dmf-s index, which consider each tooth surface as a measurement unit, having increased precision on demonstrate the patient's disease state, as was used in other few studies [Sikorskavet al., 2002; Hagh et al., 2013]. Beyond that, one of the most important confounding factor present in studies on this area is the lack of distinction between the decayed, missing or filled tooth/tooth surfaces [Fidalgo et al., 2014].

In addition, there are also differences in the inclusion criteria of the participants, regarding the disease status. Some studies only included patients who had dmf-t/DMF-T superior than 3 [Parisotto et al., 2011; Chopra et al., 2012] or than 5 teeth [Thaweboon et al., 2008; Priya et al., 2013], instead of our study, which the participant had to have only one decayed tooth surface to be included. This could be one of the factors to explain the large differences in the obtained data about s-IgA between the studies. The mean s-IgA levels in patients with dental caries observed varied between 50.4 $\mu\text{g/mL}$ [Farias and Bezerra, 2003] to 1961.4 $\mu\text{g/mL}$ [Bagherian e Asadikaram, 2012]. In the present study was found a mean level of 46.89 $\mu\text{g/mL}$ in ECCG.

On the excluded criteria used on the present study, were not included participants who presented any tooth with pulp involvement. It was made in order to avoid possible interferences in the research, since it was showed that the chronically inflamed pulp tissue could make local synthesis of IgA, differently of the health pulp tissue [Okamura et al., 1980; Skaljic-Staudt et al., 1991; Nakanishi et al., 1995]. All these restrictions at selecting the sample were to prevent the occurrence of possible bias in research. Because of this, one

limitation of the present study was the small sample size obtained, beyond the dropouts that occurred during the follow-up period. It was observed few sample losses until 2 months after dental treatment; however, at the end of 3 months, half of the children did not remain in the study due to the need to begin antibiotic treatment or because of the reoccurrence of caries lesions.

Our data shows a slight decrease in s-IgA levels from baseline until the 2 months follow-up. There is only one other longitudinal study, that showed opposite results, presenting an increase of s-IgA levels in the follow-up evaluation. However, this study made a unique sample collection one year after the initial moment, and both studied groups (caries-active and caries-free) presented higher values in the follow-up than at baseline. The authors explain that the participants were in mixed dentition period, which could have influenced the observed results [Parisotto et al., 2011]. It is evident the need of more longitudinal studies, in order to elucidate if the increased levels of s-IgA act as a protective response, or as a consequence of the imbalance caused by the established disease.

The subdivision of the ECCG according to the severity of the disease was made, in the present study, considering that participants that had 10 or more decayed surfaces were a high dmfs group. Meanwhile, different parameters were used by other researchers, who considered that the participants who present dmft/DMFT more than 6 were in high active group [Chawda et al., 2010; Omar et al., 2012]. It should be noted that the dmft/DMFT index not show only the decayed component, being not possible to identify, in these studies, which in fact is the actual history of caries of these patients. In our study, all selected participants only had the decayed component of the dmfs index, in order to avoid the confounding factors related to its past history of caries.

Regarding the microbiota studied, is well known that the cariogenic biofilm comprising a micro ecosystem with physiological properties that favor colonization, by providing properties such as adhesion and resistance to low pH levels [Takahashi and Nyvad, 2011]. *Streptococcus mutans* is an important microorganism involved in the initial process of dental caries and its salivary

levels was appointed as a strong risk indicator for ECC [Parisotto et al., 2010]. It was observed a large interindividual variability in salivary levels of s-IgA and *Streptococcus mutans*. However, some participants from ECCG showed a pattern of reduction in this both variables, seeming to show a directly proportional relationship between them. *Lactobacillus sp* is associated to the progression of the caries and in all ECC subjects it levels reduced after dental treatment.

Previous studies only compare the data between groups with dental caries and caries-free. Differently, we opted to analyze the s-IgA levels individually in all evaluation moments. Although all the participants were submitted to the dental treatment and had their cavities filled, we observed that the children with ECC that presented reduction pattern in the s-IgA levels after dental treatment also exhibited a decreasing of *Streptococcus mutans* counting during this period. As well, the children that did not reduced s-IgA levels also presented varying levels of *Streptococcus mutans*. It seems that the immunological system is directly associated to the microorganism levels, especially the *Streptococcus mutans*. This differentiated analysis proposed may represent a key to explain the large interindividual variations observed, since there are wide differences between the levels of cariogenic microorganisms and in the immunological response, which may interfere more than the clinical presence or absence of dental caries.

CONCLUSION

The present data supports that children with dental caries present higher levels of s-IgA in saliva than caries-free children. In addition, the restorative dental treatment did not show significant influence in this immunoglobulin levels during the follow-up period; it seems that s-IgA concentration are related to the *Streptococcus mutans* levels.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support from the agencies CNPq, FAPERJ, CAPES and National Institute of Science and Technology of

Structural Biology and Bioimaging (INCT-INBEB). We also thank to Nuclear Magnetic Resonance National Center Jiri Jonas and the Multidisciplinary Research Laboratory in Dentistry for all technical support provided.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there were no potential conflicts of interest in the present article.

REFERENCES

- American Academy of Pediatric Dentistry. Definition of Early Childhood Caries (ECC). 2008.
- Azevedo TD, Bezerra AC, Toledo OA. Feeding habits and severe early childhood caries in Brazilian preschool children. *Pediatr Dent* 2005, 27:28-33.
- Bagherian A, Asadikaram G. Comparison of some salivary characteristics between children with and without early childhood caries. *Indian Journal of Dental Research* 2012; 23:628–632.
- Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72(7):248-254.
- Chawda JG, Chaduvula N, Patel HR, Jain SS, Lala AK. Salivary SIgA and dental caries activity. *Indian Pediatrics* 2010; 48:719–721.
- Childers NK, Greenleaf C, Li F, Dasanayake AP, Powell WD, Michalek SM. Effect of age on immunoglobulin A subclass distribution in human parotid saliva. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18:298–301.
- Chopra M, Jadhav S, Venugopalan A, Hegde V, Chopra A. Salivary immunoglobulin A in rheumatoid arthritis (RA) with focus on dental caries: a cross-sectional study. *Clinical Rheumatology* 2012; 31:247–250.
- Dye BA, Hsu KLC, Afful J. Prevalence and measurement of dental caries in young children. *Pediatr Dent* 2015; 37(3):200-216.
- Farias DG, Bezerra AC. Salivary antibodies, amylase and protein from children with early childhood caries. *Clinical Oral Investigation* 2003; 7:154–157.
- Fidalgo TKSF, Freitas-Fernandes LB, Almeida FCL, Valente AP, de Souza PR. Longitudinal evaluation of salivary profile from children with dental caries before and after treatment. *Metabolomics* 2015; 11:583–593.
- Fidalgo TKSF, Freitas-Fernandes LB, Ammari M, Mattos CT, de Souza IP, Maia LC. The relationship between unspecific s-IgA and dental caries: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry* 2014; 42:1372-1381.

Garcia R, Borrelli B, Dhar V, Douglass J, Gomez FR, Hieftje K, Horowitz A, Li Y, Ng MW, Twetman S, Tinanoff N. Progress in Early Childhood Caries and Opportunities in Research, Policy, and Clinical Management. *Pediatric Dentistry* 2015; 37(3):294-299.

Hagh LG, Zakavi F, Ansarifard S, Ghasemzadeh O, Solgi G. Association of dental caries and salivary sIgA with tobacco smoking. *Australian Dental Journal* 2013; 58:219–223.

Hajishengallis, G: Inhibition of *Streptococcus mutans* Adherence to Saliva-Coated Hydroxyapatite by Human Secretory Immunoglobulin A (S-IgA) Antibodies to Cell Surface Protein Antigen I/II: Reversal by IgA1 Protease Cleavage; in Playfair JHL and Bancroft GJ (2 ed): *Infection and Immunity*, Oxford, 2009, vol 60, pp 5057-5064.

Kirtaniya BC, Chawla HS, Tiwari A, Ganguly NK, Sachdev V. Natural prevalence of antibody titres to GTF of *S. mutans* in saliva in high and low caries active children. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry* 2009; 27:135–138.

Kugler, J, Hess M, Haake D. Secretion of salivary immunoglobulin A in relation to age, saliva flow, mood states, secretion of albumin, cortisol, and catecholamines in saliva. *J Clin Immunol* 1992; 12(1):45-49.

Lehtonen, OP, Grahn, EM, Stahlberg, TH and Laitinen, LA. Amount and Avidity of Salivary and Serum Antibodies Against *Streptococcus mutans* in Two Groups of Human Subjects with Different Dental Caries Susceptibility. *Infection and Immunity* 1984; 43(1):308-313.

Lenander-Lumikari M, Loimaranta V. Saliva and dental caries. *Advances in Dental Research* 2000; 14:40–47.

Losso EM, Tavares MC, Silva JY, Urban CDE. Severe early childhood caries: an integral approach. *J Pediatr* 2009, 85: 295-300.

Marcotte H. and Lavoie M. Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1988; 62(1):71-109.

Milnes AR. Description and epidemiology of nursing caries. *J Public Health Dent* 1996; 56:38-50.

Misra S, Tahmassebi JF, Brosnan M. Early childhood caries--a review. *Dent Update* 2007; 34(9): 561-564.

Nakanishi T, Matsuo T, Ebisu S. Quantitative analysis of immunoglobulins and inflammatory factors in human pulpal blood from exposed pulps. *J Endod* 1995; 21(3):131-136.

Nobile CG, Fortunato L, Bianco A, Pileggi C, Pavia M. Pattern and severity of early childhood caries in Southern Italy: a preschool-based cross-sectional study. *BMC Public Health* 2014; 14:206-210.

Nogueira, RD, Sesso ML, Borges MC, Mattos-Graner RO, Smith DJ, Ferriani VP.

Salivary IgA antibody responses to *Streptococcus mitis* and *Streptococcus mutans* in preterm and fullterm newborn children. *Archives of Oral Biology* 2012; 57:647-653.

Okamura K, Maeda M, Nishikawa T, Tsutsui M. Dentinal response against carious invasion: localization of antibodies in odontoblastic body and process. *J Dent Res*. 1980; 59(8):1368-1373.

Omar OM, Khattab NM, Rashed LA. Glucosyltransferase B, immunoglobulin a, and caries experience among a group of Egyptian preschool children. *Journal of Dentistry for Children* 2012; 79:63–68.

Pal S, Mitra M, Mishra J, Saha S, Bhattacharya B. Correlation of total salivary secretory immunoglobulin A (SIgA) and mutans specific SIgA in children having different caries status. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry* 2013; 31:270–274.

Parisotto TM, King WF, Duque C, Mattos-Graner RO, Steiner-Oliveira C, Nobre-Dos-Santos M. Immunological and microbiologic changes during caries development in young children. *Caries Research* 2011; 45:377–385.

Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Silva CM, Rodrigues LK, Nobre-dos-Santos M. Early childhood caries and mutans streptococci: a systematic review. *Oral Health Prev Dent* 2010; 8:59–70.

Peltzer, K and Mongkolchat, 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.

Priya PR, Asokan S, Karthick K, Reddy NV, Rao VA. Effect of dental treatments on salivary immunoglobulin A of children with and without dental caries: a comparative study. *Indian Journal of Dental Research* 2013; 24:394.

Ranadheer E, Nayak UA, Reddy NV, Rao VA. The relationship between salivary IgA levels and dental caries in children. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry* 2011; 29:106–112.

Rúpolo, BS, Mira, JGS and Junior OK. Deficiência de IgA. *Jornal de Pediatria* 1998; 74(6):433-440.

Shelton PG, Berkowitz RJ, Forrester DJ. Nursing bottle caries. *Pediatrics* 1977; 59:777-778.

Sikorskavet, MH, Mielnik-Blaszczak M, Kapec E. The relationship between the levels of sIgA, lactoferrin and alpha (1) proteinase inhibitor in saliva and permanent dentition caries in 15-year-olds. *Oral Microbiology and Immunology* 2002; 17:272–276.

Skaljic-Staudt G, Ciglar I, Sutalo J, Cvorišćec D. Quantitative evaluation of the immunoglobulin G, A and M in the human dental pulp. *Acta Stomatol Croat* 1991; 25(1):33-38.

Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res* 2011; 90(3):294-303.

Thaweboon S, Thaweboon B, Nakornchai S, Jitmaitree S. Salivary secretory IgA, pH, flow rates, mutans streptococci and *Candida* in children with rampant caries. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2008; 39:893–899.

Valaitis R, Hesch R, Passarelli C, Sheehan D, Sinton J. A systematic review of the relationship between breastfeeding and early childhood caries. *Can J Public Health* 2000; 91(6):411-417.

World Health Organization (WHO). *Oral health surveys: basic methods* (4 ed). Geneva; World Health Organization 1998.

TABLES AND FIGURES

Table 1. Children's demographic data, localization of decayed surfaces, dietary habits, and hygiene background

Parameters	Caries-free	ECC	p-value
Child age (years)	3.7 ± 1.2	3.0 ± 1.0	0.05
Gender			
<i>Female</i>	39.1%	60.9%	0.12
<i>Male</i>	60.9%	39.1%	
Decayed surface localization			
<i>Global dmf-s</i>	0.0 ± 0.0	10.2 ± 8.1	<0.01
<i>Superior arch</i>	0.0 ± 0.0	8.0 ± 7.6	
<i>Inferior arch</i>	0.0 ± 0.0	2.2 ± 2.4	
<i>Anterior region</i>	0.0 ± 0.0	6.4 ± 6.4	0.12
<i>Posterior region</i>	0.0 ± 0.0	3.7 ± 3.9	
<i>Buccal</i>	0.0 ± 0.0	2.4 ± 2.2	0.41
<i>Lingual</i>	0.0 ± 0.0	2.0 ± 2.1	
<i>Mesial</i>	0.0 ± 0.0	1.8 ± 1.9	
<i>Distal</i>	0.0 ± 0.0	1.4 ± 1.8	
<i>Incisal/Occlusal</i>	0.0 ± 0.0	2.4 ± 1.9	
Breastfeeding habit			
<i>Breastfeeding</i>	91.3%	87.0%	0.64
<i>Exclusive breastfeeding (until 6m)</i>	40.9%	33.3%	0.63
<i>Nocturnal breastfeeding</i>	90.5%	85.0%	0.60
<i>Nocturnal hygiene</i>	15.8%	12.6%	0.85
Nursing bottle			

<i>Nocturnal nursing bottle</i>	80.0%	50.0%	0.07
Teeth brushing			
<i>More than 2 times in a day</i>	91.3%	95.7%	0.56
<i>Fluoride toothpaste use</i>	82.6%	78.3%	0.71
High sugar consumption	47.8%	65.2%	0.24

Table 2: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp* and flow rate of ECC and CF children before and after restorative treatment.

Groups	<i>Streptococcus mutans</i> (CFU/mL)	<i>Streptococcus mutans</i> p-value	<i>Lactobacillus sp</i> (CFU/mL)	<i>Lactobacillus sp</i> p-value	Flow rate (mL/min)	Flow rate p-value
Caries-free	2.9 x 10 ⁵ (± 5.4 x 10 ⁵)	0.49 ^a	1.1 x 10 ¹ (± 5.0 x 10 ¹)	0.04^a	0.185 (± 0.1)	0.32 ^a
ECC	3.0 x 10 ⁵ (± 4.1 x 10 ⁵)	0.15 ^b	1.1 x 10 ⁴ (± 2.7 x 10 ⁴)	< 0.001^b	0.172 (± 0.1)	0.86 ^b
7 days follow-up	9.1 x 10 ⁴ (± 1.9 x 10 ⁴)	<0.001^c	7.9 x 10 ² (± 1.3 x 10 ³)	< 0.001^c	0.153 (± 0.1)	0.23 ^c
1 month follow-up	2.4 x 10 ⁵ (± 6.4 x 10 ⁵)	0.04^d	8.6 x 10 ² (± 2.6 x 10 ³)	< 0.001^d	0.163 (± 0.1)	0.41 ^d
2 months follow-up	2.0 x 10 ⁵ (± 5.6 x 10 ⁵)	0.04^e	5.6 x 10 ² (± 1.9 x 10 ³)	< 0.001^e	0.188 (± 0.2)	0.35 ^e
3 months follow-up	6.1 x 10 ⁴ (± 9.5 x 10 ⁴)	0.04^f	2.8 x 10 ² (± 5.6 x 10 ²)	< 0.001^f	0.162 (± 0.1)	0.28 ^f

a = comparison between caries-free and 3 months follow-up, *b* = comparison between ECC and caries-free; *c* = comparison between ECC and 7 days follow-up; *d* = comparison between ECC and 1 month follow-up; *e* = comparison between ECC and 2 months follow-up; *f* = comparison between ECC and 3 months follow-up.

Table 3: Salivary s-IgA and total protein from ECC and CF children before and after restorative treatment.

Groups	s-IgA ($\mu\text{g/mL}$)	s-IgA p-value	Total protein ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Total protein p-value
Caries-free	25.40 (± 15.44)	0.93 ^a	39.83 (± 23.19)	0.18 ^a
ECC	46.89 (± 41.94)	0.03^b	38.14 (± 24.89)	0.64 ^b
7 days follow-up	40.87 (± 30.68)	0.58 ^c	34.59 (± 17.56)	0.75 ^c
1 month follow- up	33.70 (± 20.25)	0.17 ^d	34.65 (± 17.04)	0.72 ^d
2 months follow-up	31.46 (± 18.90)	0.20 ^e	35.18 (± 16.10)	0.88 ^e
3 months follow-up	32.94 (± 32.16)	0.18 ^f	31.78 (± 9.67)	0.72 ^f

a = comparison between caries-free and 3 months follow-up, b = comparison between ECC and caries-free; c = comparison between ECC and 7 days follow-up; d = comparison between ECC and 1 month follow-up; e = comparison between ECC and 2 months follow-up; f = comparison between ECC and 3 months follow-up.

Figure 1: *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* sp (CFU/mL in Log¹⁰ scale) from ECC and CF children at baseline and 7 days, 1 month, 2 months and 3 months follow-up after restorative dental treatment.

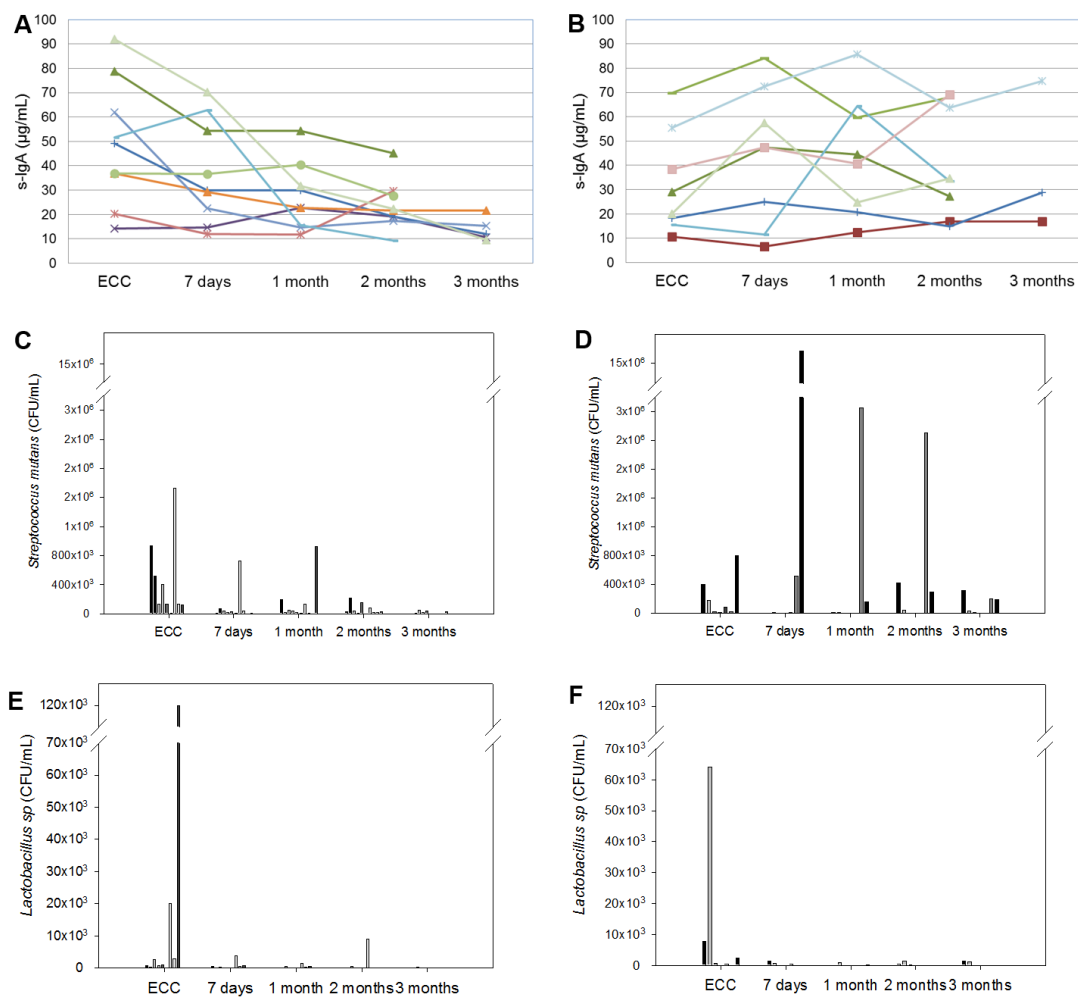
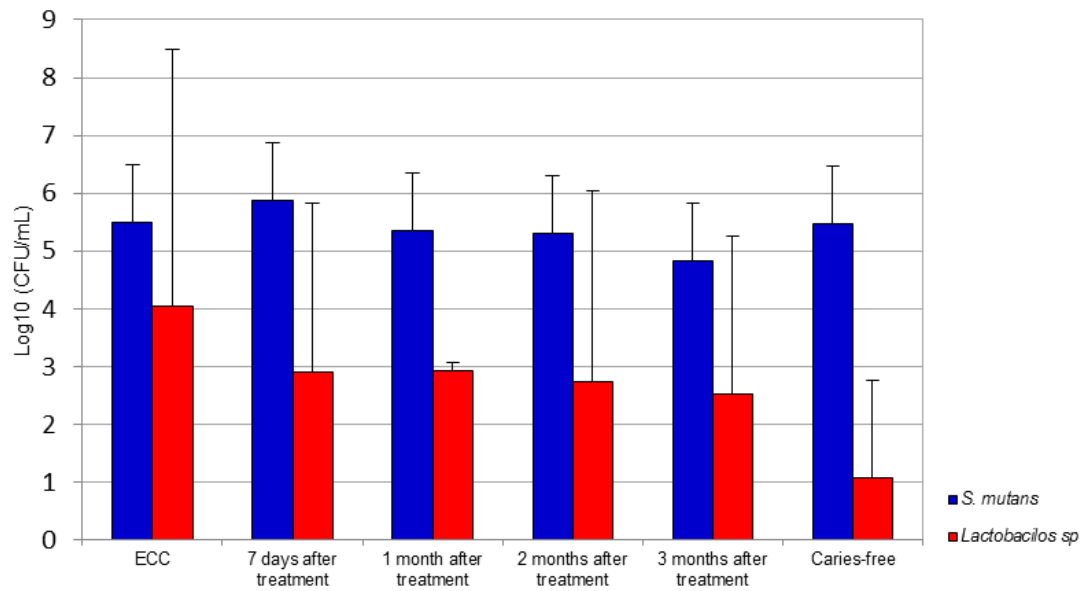


Figure 2: Individual representation of ECC patients with a pattern of reduction in s-IgA values in follow-up period (A) and with aleatory levels (B) and its salivary concentrations of *Streptococcus mutans* (C and D) and *Lactobacillus sp* (E and F).



5 DISCUSSÃO

No presente estudo, o critério de inclusão adotado para a seleção amostral foi que os participantes estivessem no período de dentição decídua completa. Esse cuidado metodológico foi adotado a fim de minimizar a ocorrência de vieses, visto que os níveis salivares de IgA-s sofrem oscilações ao longo da vida. Isso ocorre devido às mudanças fisiológicas inerentes ao crescimento e ao processo de maturação do nosso sistema imunológico (Marcotte e Lavoie, 1998). Crianças muito jovens tendem a apresentar níveis mais baixos desse anticorpo, que se elevam com o passar dos anos, devido ao aumento da competência imunológica do indivíduo e dos estímulos gerado pela microbiota bucal já estabelecida (Childers et al, 2003; Nogueira et al., 2012). Além disso, a erupção dentária parece promover alterações inflamatórias locais, que alteram a resposta do indivíduo e, conseqüentemente, promovem modificações na concentração da IgA-s na saliva (Parisotto et al., 2011).

Devido a esse critério metodológico utilizado, o estudo abordou um tipo específico de cárie dentária, denominada como cárie de acometimento precoce segundo a classificação adotada pela Academia Americana de Odontopediatria (AAPD, 2008). A cárie de acometimento precoce é uma doença complexa e multifatorial, e diversos fatores estão reconhecidamente associados à sua patogênese, como aspectos ambientais, culturais, socioeconômicos e, principalmente, comportamentais (Azevedo et al., 2005; Losso et al., 2009; Nobile et al., 2014; Peltzer and Mongkolchat, 2015). Essa doença também já recebeu a nomenclatura de cárie de mamadeira, sendo descrita como uma doença de desenvolvimento e progressão rápidas, em geral com muitos elementos dentários envolvidos e com lesões cavitadas em regiões consideradas de baixo risco (Ripa, 1988).

Observou-se que o padrão de acometimento dos elementos e superfícies dentárias pela cárie na presente amostra ocorreu do mesmo modo como é descrito na literatura, com presença significativamente maior de lesões no arco superior do que no inferior, e com mais superfícies afetadas na região anterior. Sugere-se que a região superior apresente maior número de

superfícies cariadas devido ao menor contato com a secreção salivar, que se deposita em maior quantidade no arco inferior, exercendo ali suas funções de proteção. Na região posterior há maior contato oclusal entre os dentes antagonistas, fazendo com que haja menor acúmulo de resíduos alimentares quando comparada com a região anterior (Shelton et al., 1977; Ripa, 1988; Milnes, 1996, Valaitis et al., 2000; Dye, Hsu e Afful, 2015). No presente estudo, porém, não foi observada diferença significativa entre os hábitos investigados nos dois grupos, fato que pode ser decorrente do pequeno tamanho amostral utilizado.

Uma outra alteração local que parece desencadear uma resposta do hospedeiro e alterar os níveis de IgA-s encontrados é a presença de dentes com exposição ou envolvimento pulpar por cárie. Foi demonstrado que o tecido pulpar cronicamente inflamado, ao contrário do tecido sadio, é capaz de promover a síntese local desse anticorpo (Okamura et al., 1980; Skaljac-Staudt et al., 1991; Nakanishi et al., 1995). Desse modo, também foram excluídos, no presente estudo, pacientes que tivessem dentes com necessidade de tratamentos pulpares ou lesões de cárie de extrema profundidade. Todas as restrições metodológicas aplicadas no presente estudo podem ser apontadas como responsáveis pela dificuldade na obtenção de um tamanho amostral maior, sendo essa uma das limitações do presente estudo.

As grandes diferenças metodológicas entre os estudos e a ausência de critérios de seleção rigorosos, além da carência de pesquisas com avaliações longitudinais sobre a relação IgA-s e cárie dentária parecem ser responsáveis pelos resultados contraditórios observados. As divergências vão desde aspectos como o padrão utilizado para mensuração da presença de cárie, que pode ser feita levando-se em consideração o dente (índice ceo-d) ou cada superfície dentária (índice ceo-s) como unidade de medida; até questões relativas à seleção amostral, como faixa etária dos participantes, por exemplo. Um dos maiores fatores de confundimento dos estudos existentes é a ausência de distinção entre a quantidade de dentes ou superfícies cariadas, perdidas e restauradas nos participantes (Fidalgo et al., 2014).

Na presente pesquisa, todos os participantes selecionados possuíam apenas dentes com lesões de cárie cavitadas em dentina, não sendo incluídas no estudo as crianças que apresentassem dentes perdidos por cárie ou com restaurações prévias. Esse cuidado foi adotado uma vez que o objetivo não era avaliar a história passada da doença e a repercussão de tratamentos odontológicos prévios, mas sim, o estado atual da doença, associando à microbiota com os níveis salivares de IgA-s desses indivíduos. Desse modo, o ceo-s apresentado pelos participantes do presente estudo era totalmente composto pelo componente cariado.

O presente estudo demonstrou que as crianças com cárie de acometimento precoce apresentaram níveis estatisticamente mais elevados de IgA-s que as livres de cárie. Esses dados corroboram com outros estudos, que encontraram níveis mais elevados dessa imunoglobulina na saliva de pacientes com cárie (Sikorskavet et al., 2002; Farias e Bezerra, 2003; Thaweboon et al., 2008; Parisotto et al., 2011; Ranadheer et al., 2011; Bagherian e Asadikaram, 2012; Chopra et al., 2012; Priya et al., 2013). Da mesma forma, os resultados obtidos vão de acordo com o exposto em uma revisão sistemática e metanálise sobre o tema (Fidalgo et al., 2014). Entretanto, os estudos avaliados não foram conduzidos em populações de pré-escolares; o que, aliado aos demais fatores de confundimento, pode justificar os resultados divergentes de algumas pesquisas, que observaram níveis mais elevados de IgA-s em indivíduos livres de cárie (Kirtaniya et al., 2009; Chawda et al., 2010; Hagh et al., 2013; Pal et al., 2013).

No presente estudo não foram observadas diferenças na concentração de proteína total salivar entre os grupos estudados, apesar de terem sido encontradas diferenças significativas nos níveis de IgA-s, que é uma proteína encontrada na saliva. Esses dados evidenciam que a presença da doença parece causar um desequilíbrio na proporção normal dos componentes salivares, e não somente a diminuição ou aumento de secreção de apenas um desses fatores isoladamente. Um outro componente salivar que também é alvo de estudos é a IgA anti-*mutans*, que é um anticorpo específico para antígenos protéicos do *Streptococcus mutans*. Parisotto et al. (2011), em um estudo de

avaliação longitudinal, encontraram maior concentração de IgA-s total no grupo com cárie do que no livre de cárie; porém observaram, na mesma amostra, níveis similares de IgA anti-mutans nos dois grupos. Nesse estudo, observou-se que as crianças que apresentavam baixos níveis iniciais de IgA anti-mutans tinham 7.5 vezes mais chance de desenvolver cárie dentária durante o período do estudo, o que evidencia que este anticorpo de atuação específica atua na homeostase entre a microbiota e o meio bucal.

A microbiota cariogênica parece exercer influência direta sobre a concentração da IgA-s. Os *Lactobacillus sp* são conhecidamente associados à cárie dentária, porém eles são microrganismos oportunistas, e necessitam de nichos retentivos com um microambiente em anaerobiose e acesso a carboidratos, condições que são compatíveis, na cavidade bucal, às oferecidas por lesões de cárie cavitadas. Logo, esses microrganismos estão associados à evolução do processo já instalado (Caufield et al., 2015). Os *Streptococcus mutans*, por outro lado, são associados ao início do processo da cárie, devido, dentre outros fatores, à sua capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares insolúveis a partir da degradação da sacarose, pelas enzimas glicosiltransferases, se tornando capazes de aderir às superfícies dentárias. Esses aspectos foram considerados preditores da cárie de acometimento precoce e podem explicar de maneira parcial o padrão de acometimento dessa doença (Parisotto et al., 2010; Parisotto et al., 2015).

Essa microbiota considerada cariogênica é, no entanto, parte do microbioma oral normal, presente em pacientes saudáveis. Estudos atuais investigam os fatores responsáveis por induzir sua patogenicidade. Acredita-se que mudanças no microambiente local induzem a seleção e proliferação de organismos mais resistentes, dando origem à um desequilíbrio local e iniciando o processo de doença (Takahashi, 2015). As diferenças microbiológicas individuais parecem ser a chave para elucidar porque há uma variação interindividual tão grande nas concentrações salivares de IgA-s. Os níveis dessa imunoglobulina variam desde 50.4 µg/mL (Farias and Bezerra, 2003) até 1961.4 µg/mL (Bagherian e Asadikaram, 2012), sendo observadas também grandes discrepâncias nos valores entre participantes de uma mesma pesquisa

e até mesmo de um mesmo grupo, causando o grande desvio padrão comumente observado nos dados dos estudos. Esse fato, aliado às grandes diferenças interindividuais nos valores da microbiota cariogênica salivar observadas, levanta o questionamento sobre o papel dos microrganismos na indução da produção de IgA-s, podendo representar uma variável mais significativa do que a presença ou não da doença cárie clinicamente.

No presente estudo, observou-se que a realização do tratamento odontológico restaurador não alterou de maneira significativa a concentração da IgA-s salivar. Logo, foi proposta uma abordagem diferenciada das realizadas nas demais pesquisas, na qual foram avaliadas individualmente as variações da IgA-s nos participantes do grupo com cárie de acometimento precoce ao longo do período de acompanhamento. Observou-se que, enquanto alguns indivíduos apresentavam concentrações oscilatórias de IgA-s, com variações entre aumento e diminuição, outros demonstravam uma curva de redução desses níveis durante esse período. Separando-se esses pacientes em dois subgrupos, constatou-se que naqueles em que os níveis de IgA-s foram reduzindo após o tratamento odontológico, também foi observada redução nos níveis de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus sp*. Por outro lado, nos pacientes com níveis oscilatórios desse anticorpo na saliva foi observada redução apenas de *Lactobacillus sp*, enquanto o comportamento dos níveis salivares de *Streptococcus mutans* também foi aleatório.

Observou-se que a concentração de IgA-s salivar estava mais fortemente associada aos níveis de *Streptococcus mutans* do que à presença e número de lesões, uma vez que a remoção das cavidades existentes, através da realização do tratamento restaurador, não implica necessariamente que o paciente alcance o equilíbrio microbiológico. Verificou-se também que os níveis de *Streptococcus mutans* encontrados parecem estar mais fortemente associados à concentração da IgA-s, e que os níveis de *Lactobacillus sp*, de uma forma geral, apresentam redução após a remoção das cavidades dentárias.

Constatou-se, com base nos presentes dados e na literatura existente, que há grande variabilidade nos níveis de IgA-s e de microrganismos salivares entre os indivíduos. Logo, a relação entre a quantidade de microrganismos cariogênicos e a concentração de IgA-s parece ser decisiva sobre o papel desse anticorpo na proteção ou apenas como resultado da resposta imunológica. Acredita-se que pacientes com altos níveis salivares de IgA e baixas concentrações de *Streptococcus mutans* apresentem baixo risco à doença, enquanto que os pacientes que possuem baixos níveis de IgA e altas concentrações de *Streptococcus mutans* são considerados de alto risco à ocorrência da cárie dentária (Wennerholm e Emilson, 2013). Desse modo, o presente trabalho demonstrou, por meio de um modelo de intervenção associado ao acompanhamento longitudinal pós-tratamento, que os níveis de IgA-s salivar estão diretamente relacionados à resposta do hospedeiro contra a doença, apresentando uma relação direta com a microbiota associada a ela, especialmente o *Streptococcus mutans*, e não estando diretamente ligados apenas à presença ou não da cárie dentária.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos no presente estudo, conclui-se que crianças com cárie de acometimento precoce apresentam níveis mais elevados de IgA-s do que crianças livres de cárie, e que a realização do tratamento odontológico restaurador não influenciou de modo significativo nas concentrações salivares dessa imunoglobulina, no período estudado. Foi observada relação direta entre redução das concentrações de *Streptococcus mutans* e dos níveis de IgA-s em alguns pacientes do grupo com cárie de acometimento precoce durante o acompanhamento pós-tratamento restaurador.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Academia Americana de Odontopediatria. Definition of Early Childhood Caries (ECC). 2008.

Azevedo, T. D., Bezerra, A. C., Toledo, O. A. Feeding habits and severe early childhood caries in Brazilian preschool children. Pediatr Dent, v.27, p.28-33. 2005.

Bagherian, A., Asadikaram, G. Comparison of some salivary characteristics between children with and without early childhood caries. Indian Journal of Dental Research; v.23, p.628–632. 2012.

Baginska, J., Stokowska, W. Dietary habits and early childhood caries intensity among young children. Wiad Lek, v.59, n.1-2, p.5-9. 2006.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem; v.72, n.7, p.248-254. 1976.

Camacho, M. E. I., Perez, L. S. *et al.* Relationship between severe early childhood caries, mother's oral health and mutans streptococci in a low-income group: changes from 1996 to 2007. J Clin Pediatr Dent; v.33, n.3, p.241-246. 2009.

Caufield, P. W., Schön, C.N., *et al.* Oral Lactobacilli and Dental Caries: A Model for Niche Adaptation in Humans. J Dent Res; v.94, n.9, p.110S-118S. 2015.

Chawda, J. G., Chaduvula, N., *et al.* Salivary SIgA and dental caries activity. Indian Pediatrics; v.48, p.719–721. 2010.

Childers, N. K., Greenleaf, C., *et al.* Effect of age on immunoglobulin A subclass distribution in human parotid saliva. Oral Microbiol Immunol; v.18, p.298–301. 2003.

Chopra, M., Jadhav, S., *et al.* Salivary immunoglobulin A in rheumatoid arthritis (RA) with focus on dental caries: a cross-sectional study. Clinical Rheumatology; v.31, p.247–250. 2012.

Clarke, J. K. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. Br J Exp Pathol, v.5, p.141-147. 1924.

Clementino, M. A., Gomes, M. C., *et al.* Perceived Impact of Dental Pain on the Quality of Life of Preschool children and Their Families. PLoS ONE; v.10, n.6, e0130602. doi:10.1371/journal.pone.0130602. 2015.

Dawes, C., Pedersen, A. M., *et al.* The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. Arch Oral Biol; v.60, n.6, p.863-874. 2015.

Dye, B.A., Hsu, K. L. C., Afful, J. Prevalence and measurement of dental caries in young children. Pediatr Dent; v.37, n.3, p.200-216. 2015.

Farias, D. G., Bezerra, A. C. Salivary antibodies, amylase and protein from children with early childhood caries. Clinical Oral Investigation; v.7, p.154–157. 2003.

Fejerskov, O. Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. Caries Res; v.38, p.182–191. 2004.

Fidalgo, T. K. S. F., Freitas-Fernandes, L. B., *et al.* The relationship between unspecific s-IgA and dental caries: A systematic review and meta-analysis. Journal of Dentistry; v.42, p.1372-1381. 2014.

Fidalgo, T. K. S. F., Freitas-Fernandes, L. B., *et al.* Longitudinal evaluation of salivary profile from children with dental caries before and after treatment. Metabolomics; v.11, p.583-593. 2015.

Garcia, R., Borrelli, B., *et al.* Progress in Early Childhood Caries and Opportunities in Research, Policy, and Clinical Management. Pediatric Dentistry; v.37, n.3, p.294-299. 2015.

Gudino, S., Rojas, N. *et al.* Colonization of mutans streptococci in Costa Rican children from a high-risk population. J Dent Child (Chic); v.74, n.1, Jan-Apr, p.36-40. 2007.

Hagh, L. G., Zakavi, F., *et al.* Association of dental caries and salivary sIgA with tobacco smoking. Australian Dental Journal; v.58, p.219–223. 2013.

Horst, O. V., Horst, J. A. *et al.* Caries induced cytokine network in the odontoblast layer of human teeth. Bio Med Central Immunology, v.12, n.9, p.1-13. 2011.

Kirtaniya, B.C., Chawla, H.S., *et al.* Natural prevalence of antibody titres to GTF of *S. mutans* in saliva in high and low caries active children. Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry; v.27, p.135–138. 2009.

Kugler, J., Hess, M., Haake, D. Secretion of salivary immunoglobulin A in relation to age, saliva flow, mood states, secretion of albumin, cortisol, and catecholamines in saliva. J Clin Immunol 1992; v.12, n.1, p.45-49. 1992.

Law, V., Seow, W. K. *et al.* Factors influencing oral colonization of mutans streptococci in young children. Aust Dent J, v.52, n.2, p.93-100. 2007.

Lehtonen, O. P., Grahn, E. M., *et al.* Amount and Avidity of Salivary and Serum Antibodies Against *Streptococcus mutans* in Two Groups of Human Subjects with Different Dental Caries Susceptibility. *Infection and Immunity*; v.43, n.1, p.308-313. 1984.

Losso, E. M., Tavares, M. C., *et al.* Severe early childhood caries: an integral approach. *J Pediatr*; v.85, p.295-300. 2009.

Marcotte, H., Lavoie, M. Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; v.62, n.1, p.71-109. 1988.

Martins-Júnior, P. A., Vieira-Andrade, R. G., *et al.* Impact of Early Childhood Caries on the Oral Health-Related Quality of Life of Preschool Children and Their Parents. *Caries Res*; v.47, p.211–218. 2013.

Mattos-Graner, R. O., Smith, D. J., *et al.* Water-insoluble glucan synthesis by *mutans streptococcal* strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J Dent Res*; v.79, n.6, p.:1371-1377. 2000.

Milnes, A. R. Description and epidemiology of nursing caries. *J Public Health Dent*; v.56, p.38-50. 1996.

Ministério da Saúde. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília. 1ª edição. 2012.

Misra, S., Tahmassebi, J. F., Brosnan, M. Early childhood caries--a review. *Dent Update*; v.34, n.9, p. 561-564. 2007.

Nakanishi, T., Matsuo, T., Ebisu, S. Quantitative analysis of immunoglobulins and inflammatory factors in human pulpal blood from exposed pulps. *J Endod*; v.21, n.3, p.131-136. 1995.

Nobile, C. G., Fortunato, L., *et al.* Pattern and severity of early childhood caries in Southern Italy: a preschool-based cross-sectional study. *BMC Public Health*; v.14, p.206-210. 2014.

Nogueira, R. D., Sesso, M. L., *et al.* Salivary IgA antibody responses to *Streptococcus mitis* and *Streptococcus mutans* in preterm and fullterm newborn children. *Archives of Oral Biology*; v.57, p.647-653. 2012.

Okamura, K., Maeda, M., *et al.* Dentinal response against carious invasion: localization of antibodies in odontoblastic body and process. *J Dent Res*; v.59, n.8, p.1368-1373. 1980.

Omar, O. M., Khattab, N. M., Rashed, L. A. Glucosyltransferase B, immunoglobulin A, and caries experience among a group of Egyptian preschool children. *Journal of Dentistry for Children*; v.79, n.63–68. 2012.

Pal, S., Mitra, M., *et al.* Correlation of total salivary secretory immunoglobulin A (SIgA) and mutans specific SIgA in children having different caries status. Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry; v.31, n.270–274. 2013.

Parisotto, T. M., King, W. F., *et al.* Immunological and microbiologic changes during caries development in young children. Caries Research; v.45, p.377–385. 2011.

Parisotto, T. M., Steiner-Oliveira, C., *et al.* Early childhood caries and mutans streptococci: a systematic review. Oral Health Prev Dent; v.59, n.8, p.70. 2010.

Parisotto, T. M., Stipp, R., *et al.* Can insoluble polysaccharide concentration in dental plaque, sugar exposure and cariogenic microorganisms predict early childhood caries? A follow-up study. Arch Oral Biol; v.60, n.8, p.1091-1097. 2015.

Peltzer, K., Mongkolchati, A. Severe early childhood caries and social determinants in three-year-old children from Northern Thailand: a birth cohort study. BMC Oral Health; v.15, p.108. 2015.

Pereira, G. A. *et al.* Imunologia da cárie dentária. Acta Med Port. V.23, n.4, p.663-668. 2010.

Priya, P. R., Asokan, S., *et al.* Effect of dental treatments on salivary immunoglobulin A of children with and without dental caries: a comparative study. Indian Journal of Dental Research; v.24, p.394-399. 2013.

Proctor, G. B., Carpenter, G. H., *et al.* Nerve-evoked secretion of immunoglobulin A in relation to other proteins by parotid glands in anaesthetized rat. Exp Physiol; v.85, n.5, p.512-518. 2000.

Ranadheer, E., Nayak, U. A., *et al.* The relationship between salivary IgA levels and dental caries in children. Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry; v.29, p.106–112. 2011.

Ripa, L. W. Nursing caries: a comprehensive review. Pediatric Dentistry; v.10, n.4, p.268-282. 1988.

Rúpolo, B. S., Mira, J. G. S., Junior, O. K. Deficiência de IgA. Jornal de Pediatria; v.74, n.6, p.433-440. 1998.

Santos, M. N. *et al.* Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. Caries Res, v.36, n.5, p.347-52. 2002.

Schroth, R. J., Brothwell, D. J. *et al.* Caregiver knowledge and attitudes of preschool oral health and early childhood caries (ECC). Int J Circumpolar Health, v.66, n.2, Apr, p.153-167. 2007.

Shelton, P. G., Berkowitz, R. J., Forrester, D. J. Nursing bottle caries. Pediatrics; v.59, p.777-778. 1977.

Sikorskavet, M. H., Mielnik-Blaszczak, M., Kapec, E. The relationship between the levels of sIgA, lactoferrin and alpha (1) proteinase inhibitor in saliva and permanent dentition caries in 15-year-olds. Oral Microbiology and Immunology; v.17, p.272–276. 2002.

Skaljic-Staudt, G., Ciglar, I., *et al.* Quantitative evaluation of the immunoglobulin G, A and M in the human dental pulp. Acta Stomatol Croat; v.25, n.1, p.33-38. 1991.

Svec, P., Sedlacek, I. *et al.* Lactobacillus spp. associated with early childhood caries. Folia Microbiol (Praha), v.54, n.1, p.53-58. 2009.

Takahashi, N. Oral Microbiome Metabolism: From “Who Are They?” to “What Are They Doing?” Journal of Dental Research; v.94, n.12, p.1628–1637. 2015.

Takahashi, N., Nyvad, B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. J Dent Res; v.90, n.3, p.294-303. 2011.

Takahashi, N., Nyvad, B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. Caries Research, v.42, n.6, p.409–418. 2008.

Thaweboon, S., Thaweboon, B., *et al.* Salivary secretory IgA, pH, flow rates, mutans streptococci and Candida in children with rampant caries. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health; v.39, p.893–899. 2008.

Touger-Decker, R., Van Loveren, C. Sugars and dental caries. Am J Clin Nutr, v.78, n.4, Oct, p.881S-892S. 2003.

Valaitis, R., Hesch, R., *et al.* A systematic review of the relationship between breastfeeding and early childhood caries. Can J Public Health; v.91, n.6, p.411-417. 2000.

Wennerholm, K., Emilson, C. G. Comparison of Saliva-Check Mutans and Saliva-Check IgA Mutans with the Cariogram for caries risk assessment. Eur J Oral Sci; v.121, p.389–393. 2013.

8 APÊNDICES

8.1 Apêndice 1: Termo de Assentimento Livre e Esclarecido



FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOPEDIATRIA E ORTODONTIA
DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do público do projeto de pesquisa: **“Proteção contra cárie e quantidade de bactérias medidos em crianças cárie antes e depois do tratamento”**

Seu filho (a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa sobre a proteção contra cárie e quantidade de bactérias medidos em crianças cárie antes e depois do tratamento. Os Pesquisadores Aline dos Santos Letieri, Tatiana Kelly da Silva Fidalgo, Liana Bastos Freitas Fernandes e Ivete Pomarico Ribeiro de Souza pretendem realizar um estudo com as seguintes características:

Objetivo do estudo: relacionar alguns componentes presentes na saliva responsáveis pela proteção contra cárie e a contagem de bactérias a saúde da boca de crianças com cárie antes e após tratamento dentário.

O motivo que nos leva a estudar esse assunto é que os achados sobre a relação entre esses fatores de proteção da saliva relacionados à doença cárie não estão claros nas pesquisas anteriores. Além disso, existirem indivíduos com higiene não adequada e/ou alto consumo de açúcar e que não apresentam a doença cárie, sugerindo a existência, nesses casos, de outros fatores de interferência direta nesse processo. Na pesquisa, será retirada um pouco de saliva da sua boca com um canudo de plástico, vamos tirar fotos dos dentes, contar os dentes e olhar sua boca. Se algum dente estiver com o bicho da cárie, nós vamos limpar ele e colocar uma massinha nele. Você não sentirá nenhum incômodo ou desconforto.

Riscos: Os riscos relacionados a esta pesquisa são os mesmos relacionados a qualquer tratamento odontológico. Para diminuir os riscos durante os exames clínicos e radiográficos serão utilizados, tanto para o dentista quanto para o paciente, equipamentos de proteção pessoal e protetores de chumbo. O tratamento será realizado em local reservado evitando assim qualquer tipo de constrangimento.

Garantia de acesso aos pesquisadores: Em qualquer fase do estudo você terá pleno acesso a pesquisadora responsável, Ivete Pomarico Ribeiro de Souza, pelos telefones 999943131, 2562-2101 ou 2562-2098, Av. Brigadeiro Trompowsky, s/n, Cidade Universitária, Rio de Janeiro.

Garantia de liberdade: Sua participação neste estudo é absolutamente voluntária. Dentro deste raciocínio, todos os participantes estão integralmente livres para, a qualquer momento, negar o consentimento ou desistir de participar e retirar o consentimento, sem que isto provoque qualquer tipo de penalização. Lembramos,

assim, que sua recusa não trará nenhum prejuízo à relação com o pesquisador ou com a instituição e sua participação não é obrigatória. Mediante a aceitação, espera-se que você compareça as consultas de tratamento e responda os questionários.

Direito de confidencialidade e acessibilidade: os dados resultantes da presente pesquisa serão utilizados para elaborar artigos científicos. Porém, todas as informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o absoluto sigilo de sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar a identificação do participante e ninguém, com exceção dos próprios pesquisadores, poderá ter acesso aos resultados da pesquisa. Cada participante somente poderá ter acesso aos próprios resultados.

Despesas e compensações: você não terá, em momento algum, despesas financeiras pessoais. As despesas, assim, se por ventura ocorrer, serão de responsabilidade dos próprios pesquisadores. Também, não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Todo tratamento necessário a realização desta pesquisa será livre de custo. Os pesquisadores também ressarcimento e indenização no caso do voluntário sentir-se prejudicado.

Em caso de dúvidas ou questionamentos, você pode se manifestar agora ou em qualquer momento do estudo para explicações adicionais.

Caso surja alguma dúvida quanto à ética do estudo, o(a) Sr.(a) deverá se reportar ao Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo seres humanos – subordinado ao Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, órgão do Ministério da Saúde, através de solicitação ao representante de pesquisa, que estará sob contato permanente, ou contatando o Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição, no endereço Rua Rodolpho Paulo Rocco, 255 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão, 1º andar; Contato: 3938-2480 Fax: 3938-2481; Horário de funcionamento: De segunda a sexta-feira, das 8h às 15h.

É assegurado o completo sigilo de sua identidade quanto a sua participação neste estudo, incluindo a eventualidade da apresentação dos resultados deste estudo em congressos e periódicos científicos.

Eu, _____,
portador (a) do documento de Identidade
_____, responsável pelo menor
_____ fui informado (a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e poderei modificar a decisão de participar se assim desejar. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 20_____

Nome da criança

Assinatura da criança

Nome do responsável

Assinatura do(a) responsável

Assinatura do(a) pesquisador(a)

Termo de assentimento da criança voluntária

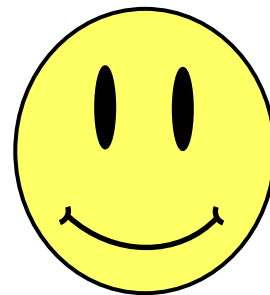
Eu, _____ deixo que a dentista Aline dos Santos Letieri, olhe a minha boca, conte os meus dentes e veja como eles estão, tire foto dos dentes, passe fio dental, tire um pouco da minha saliva com um canudinho de plástico e que, caso meus dentes tenham o bicho da cárie, que ela limpe e coloque uma massinha neles.

Marque a sua opção:

Não ()



Sim ()



8.2 Apêndice 2: Ficha de exame dentário

Ficha de exame de cárie dentária (Índice ceo-s)

65 55 54 53 52 51 61 62 63 64

Vestibular										
Palatina										
Mesial										
Distal										
Oclusal										

85 84 83 82 81 71 72 73 74 75

Vestibular										
Lingual										
Mesial										
Distal										
Oclusal										

c	e	o	ceo-s total

LEGENDA (superfície):

H = Hígida

C = Cavitada em dentina

8.3 Apêndice 3: Anamnese



FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOPEDIATRIA E ORTODONTIA
DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

Anamnese

Paciente Nº: _____ Data: ____/____/____

Nome: _____

Endereço: _____

Cep: _____ Cidade: _____

Telefones _____/_____

Nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Sexo: _____

1 - Tem alguma alteração sistêmica?

() Não () Sim

Caso sim, qual? _____

2 – Usa medicamentos continuamente?

() Não () Sim

Caso sim, qual? _____

3 - Quando foi a última vez que tomou antibiótico ou anti-histamínico?

4 – Amamentação no peito?

() Não () Sim

Caso sim, até quando? _____

5 - Mamava de madrugada?

() Não () Sim

Caso sim, limpava? () Não () Sim

6 – Mamou no peito exclusivamente?

() Não () Sim

Caso sim, até quantos anos? _____

7 – Amamentação artificial (mamadeira)?

() Não () Sim

Caso sim, até quantos anos? _____

Intervalo entre as mamadas: _____

Conteúdo da mamadeira: _____

8 - Toma mamadeira para dormir?

() Não () Sim

Caso sim, até quantos anos? _____

9 - Toma mamadeira dormindo?

() Não () Sim

Caso sim, até quantos anos? _____

10 – Escova os dentes? () Não () Sim

11 - Quem escova os dentes? () A criança () O responsável

12 – Quantas vezes ao dia? _____

Horários: _____

13 – Usa pasta com flúor? () Não () Sim

Qual pasta: _____

14 – Come muito doce? () Não () Sim

Aproximadamente quantas vezes por dia? _____

8.4 Apêndice 4: Ficha dos resultados das análises laboratoriais

Parâmetros bioquímicos e microbiológicos

- **Fluxo Salivar (mL/min)**

Antes: _____

1 semana: _____

1 Mês: _____

2 Meses: _____

3 Meses: _____

- ***Lactobacilos* (UFC/mL)**

Antes: _____

1 semana: _____

1 Mês: _____

2 Meses: _____

3 Meses: _____

- ***S. mutans* (UFC/mL)**

Antes: _____

1 semana: _____

1 Mês: _____

2 Meses: _____

2 Meses: _____

- **Proteínas totais ($\mu\text{g/mL}$)**

Antes: _____

1 semana: _____

1 Mês: _____

2 Meses: _____

3 Meses: _____

- **IgA-s ($\mu\text{g/mL}$)**

Antes: _____

1 semana: _____

1 Mês: _____

2 Meses: _____

3 Meses: _____

9 ANEXOS

9.1 Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UFRJ)

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
(HUCFF/ UFRJ)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PROTEÇÃO CONTRA CÁRIE E QUANTIDADE DE BACTÉRIAS MEDIDOS EM CRIANÇAS CÁRIE ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO

Pesquisador: Tatiana Kelly da Silva Fidalgo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 37868914.3.0000.5257

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 934.503

Data da Relatoria: 14/01/2015

Apresentação do Projeto:

Protocolo 242-14 do grupo III. Respostas recebidas em 23.12.2014.

Foram anexados à Plataforma Brasil: 1- Folha de Rosto assinada; 2- Declaração de ausência de Instituição Coparticipante; 3- Projeto de pesquisa, 4- TCLE; 5- Listagem dos currículos dos pesquisadores; 6- Termo de ciência; 7-relação dos documentos anexados.

Objetivo da Pesquisa:

ver substanciado de 29/11/2014

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

ver substanciado de 29/11/2014

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

ver substanciado de 29/11/2014

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

ver substanciado de 29/11/2014

Recomendações:

não há

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco N°255 Sala 01D-46
Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
(HUCFF/ UFRJ)



Continuação do Parecer: 934.503

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

RESPOSTA AOCOMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

1- O título público pode diferir do título científico e deve ser compreensível para qualquer cidadão brasileiro usuário da Plataforma Brasil e não deve conter, portanto, termos técnicos e de difícil compreensão. Solicita-se adequação.

R: O título público foi alterado para:

“PROTEÇÃO CONTRA CÁRIE E QUANTIDADE DE BACTÉRIAS MEDIDOS EM CRIANÇAS CÁRIE ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO”

Análise: pendência atendida

2- As características e os critérios que serão utilizados para se decidir por incluir ou excluir os participantes da pesquisa precisam ser claramente descritos no itens <<Critérios de Inclusão>> e <<Critérios de Exclusão>>. Não foram explicitados de modo suficientemente claro os critérios de inclusão. Solicita-se adequação.

R: Os critérios de inclusão foram completados:

“Para participarem do estudo, os pacientes deverão se enquadrar nos seguintes critérios:

- Estarem na fase de dentição decídua;
- Estarem na idade dentre 1 ano e 6 anos de idade;
- Serem saudáveis sistemicamente;
- Crianças que apresentem ausência de cárie (grupo controle) e crianças com pelo menos 2 superfícies cariadas (grupo experimental);
- Concordarem em participar da pesquisa, através da assinatura do termo de assentimento livre e esclarecido, quando for possível assinar, e ter o consentimento verbal e por escrito dos seus responsáveis, através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.”

Assim, como os de exclusão:

“Os critérios de exclusão para participação na pesquisa são:

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco N°255 Sala 01D-46
Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
(HUCFF/ UFRJ)



Continuação do Parecer: 934.503

- Início de erupção de qualquer elemento dentário permanente;
- Presença de doença sistêmica, segundo relato dos responsáveis;
- Uso de antibióticos nos últimos três meses;
- Realização de tratamento odontológico restaurador ou exodontias anteriormente;
- Presença de sangramentos bucais;
- Pacientes que não cooperem com o atendimento;
- Pacientes que possuam dentes com lesões de cárie muito extensas e/ou com acometimento pulpar, havendo necessidade de tratamento endodôntico ou exodontias."

Análise: pendência atendida

3- Quanto ao processo de obtenção de consentimento:

3.1- Não foram descritos na metodologia do projeto os procedimentos de recrutamento e de obtenção de consentimento dos participantes da pesquisa. Solicita-se adequação.

R: Foi inserido os procedimentos para coleta do TCLE:

"Será selecionada uma amostra probabilística aleatória simples, no período de Janeiro a Abril de 2015, dentre os pacientes que buscarem atendimento na Clínica da Disciplina de Odontopediatria da FO-UFRJ, no setor de Triagem. Os voluntários serão examinados. E após explicada a pesquisa, lido e explicado detalhadamente os termos do TCLE, o TCLE será assinado e os pacientes selecionados serão divididos em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de lesões de cárie"

Análise: pendência atendida

3.2- Sobre o TCLE:

3.2.1- Por se tratar de pesquisa com menores de idade, além do TCLE dirigido aos responsáveis legais, também é necessário, termo de assentimento a ser assinado pelas crianças e adolescentes que se pretende recrutar.

R: O TCLE foi modificado, de forma que as crianças possam assinar e, em caso de não saberem

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco N°255 Sala 01D-46
Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
(HUCFF/ UFRJ)



Continuação do Parecer: 934.503

assinar devido a pouca idade, foi incluída a opção de marcar um "X". O termo modificado encontra-se em anexo.

Análise: pendência atendida

3.2.2- O título público deve diferir do título científico, deve ser compreensível para qualquer cidadão brasileiro usuário da Plataforma Brasil e não deve conter, portanto, termos técnicos e de difícil compreensão. Solicita-se adequação.

R: O título público foi alterado para:

"PROTEÇÃO CONTRA CÁRIE E QUANTIDADE DE BACTÉRIAS MEDIDOS EM CRIANÇAS CÁRIE ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO"

Análise: pendência atendida

3.2.3- Não foram mencionadas as garantias de ressarcimento e indenização. Solicita-se adequação.

R: O termo foi reformulado, como pode ser observado no anexo. Segue a alteração do trecho:

"Todo tratamento necessário a realização desta pesquisa será livre de custo. Os pesquisadores também ressarcimento e indenização no caso do voluntário sentir-se prejudicado."

Análise: pendência atendida

3.2.4- Termos técnicos e de difícil compreensão para o público alvo do TCLE ou TALE devem ser evitados. Solicita-se adequação

R: Todo o TCLE foi modificado, de forma a simplificar a linguagem e tornar acessível aos participantes do estudo. O termo modificado encontra-se em anexo.

Análise: pendência atendida

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
(HUCFF/ UFRJ)



Continuação do Parecer: 934.503

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- 1) De acordo com o item XI.2.d, da Resolução CNS n.º 466/12, é da responsabilidade do pesquisador apresentar relatórios parciais e final durante execução da pesquisa.
- 2) Eventuais emendas (modificações) ao protocolo devem ser apresentadas, com justificativa, ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada.

RIO DE JANEIRO, 19 de Janeiro de 2015

Assinado por:
Carlos Alberto Guimarães
(Coordenador)

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br