

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Centro de Ciências da Saúde
Faculdade de Odontologia

Gabriela Pereira Fontes

**CÁRIE DENTÁRIA E ERUPÇÃO DOS DENTES DECÍDUOS
COMO DETERMINANTES DO PERFIL METABOLÔMICO
SALIVAR**

Rio de Janeiro
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Centro de Ciências da Saúde

Faculdade de Odontologia

Gabriela Pereira Fontes

**CÁRIE DENTÁRIA E ERUPÇÃO DOS DENTES DECÍDUOS COMO
DETERMINANTES DO PERFIL METABOLÔMICO SALIVAR**

Dissertação de mestrado submetida 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).

Orientadores:

Profa. Dra. Ivete Pomarico Ribeiro de Souza

Profa. Titular, Departamento de Odontopediatria e Ortodontia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Profa. Dra. Tatiana Kelly da Silva Fidalgo

Profa. Adjunta, Departamento de Odontologia Preventiva e Comunitária, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Rio de Janeiro

2021



UFRJ
faz **100**
ANOS
1920 | 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

GABRIELA PEREIRA FONTES

“CÁRIE DENTÁRIA E ERUPÇÃO DOS DENTES DECÍDUOS COMO DETERMINANTES DO PERFIL METABOLÔMICO SALIVAR”

Dissertação de mestrado submetida 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).

Rio de Janeiro, 30 de junho de 2021.

Prof.^ª Dr.^ª ADILIS KALINA ALEXANDRIA DE FRANÇA

DO – Prof.^ª Adjunta do Departamento de Odontologia Preventiva e Comunitária da UERJ

Prof.^ª Dr.^ª GLÓRIA FERNANDA BARBOSA DE ARAÚJO CASTRO

DO – Prof.^ª Associada do Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da FO/UFRJ

Prof. Dr. MARCELO DE CASTRO COSTA

DO – Prof. Associado do Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da FO/UFRJ

FICHA CATALOGRÁFICA

Fontes, Gabriela Pereira.

Cárie dentária e erupção dos dentes decíduos como determinantes do perfil metabólico salivar. / Gabriela Pereira Fontes. – Rio de Janeiro: UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Odontologia, 2021.

85 f.: il.; 31 cm.

Orientadoras: Ivete Pomarico Ribeiro de Souza; Tatiana Kelly da Silva Fidalgo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Odontopediatria), 2021.

Referências: f. 68-73.

1. Cárie Dentária. 2. Dente Decíduo. 3. Espectroscopia de Ressonância Magnética. 4. Metaboloma. 5. Saliva. 6. Saúde Bucal. 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.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe de Referência da Biblioteca Central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

DEDICO

A Deus, meu alicerce, caminho e verdade, que me orienta e
conduz em cada passo da minha vida.

Minha família, minha força e razão de viver.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- À **Profa Dra Ivete Pomarico**, pela honra e oportunidade de realizar este trabalho, ampliar meus conhecimentos e poder aprender com uma pessoa de tanto prestígio, que ensina, com elegância, que devemos fazer o melhor que podemos. Obrigada pela paciência e principalmente pela compreensão e sensibilidade em tempos tão difíceis, este com certeza foi o maior dos ensinamentos. Tenho um carinho e uma admiração enormes pela sr^a!
- À **Profa Dra Liana Fernandes**, pelo profissionalismo, apoio, gentileza e palavras de motivação e carinho, principalmente nos momentos mais difíceis. Obrigada por estar sempre por perto e disposta a ajudar, você me ensinou que os problemas dos outros são tão importantes quanto os nossos.
- À **Profa Dra Tatiana Fidalgo**, pela paciência, sutileza e compreensão. Obrigada pela confiança depositada em mim, muitas vezes cheguei a pensar que não merecia tanto. Obrigada por sempre encontrar um tempo para me ajudar, na sua agenda tão corrida e cheia de afazeres. Sem você isso não seria possível. Seu esforço e inteligência são uma inspiração para mim!
- À **Profa Dra Aline Letieri**, pela paciência, amizade e por cada minuto a mim dedicado, serei sempre grata! Aprendi muito com a sua eficiência, organização e busca pela perfeição, sem contar a abnegação e disponibilidade. Descobri com você que não alcançamos a perfeição, mas podemos chegar muito perto disso.
- À **Profa Dra Ana Paula Canedo Valente**, agradeço o apoio e confiança. Obrigada por abrir as portas do laboratório e permitir que a existência desse trabalho. Obrigada pela oportunidade e parceria com o **Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas**.

AGRADECIMENTOS

- A **Deus** por orientar os meus caminhos e mostrar que os planos Dele sempre superam os meus.
- À minha mãe, **Eliane Retori**, pelo carinho, paciência e por ser uma guerreira, que me ensinou a encarar a vida. Pelo apoio que me fez chegar até aqui, você é a grande responsável por isso, sem ele não chegaria a lugar algum. Obrigada por acreditar nos meus sonhos e fazer isso possível!
- Ao meu pai, **Fabiano de Moura Fontes**, que mesmo de longe nunca deixou de me apoiar, incentivar e me instigar a ser o melhor que posso em tudo o que eu faço.
- Ao meu padrasto, **Jeferson Flores Retori**, por todo apoio, exemplo e ensinamentos diários que ajudaram a me tornar quem eu sou hoje.
- À minha madrasta, **Maria Valéria Bezerra**, pelo exemplo, apoio e por toda ajuda.
- À minha irmã, **Fabieli Fontes**, por ser um exemplo e inspiração para mim desde muito pequena, por todos os ensinamentos e parceria sempre.
- Ao meu irmão, **Tiago Fontes**, pelo apoio, amizade e por estar ao meu lado, não só neste momento, mas nos momentos mais importantes da minha vida até hoje.
- À minha irmã, **Júlia Retori**, pela sensibilidade, amizade, cuidado e parceria. Por estar sempre pronta e disposta a me ajudar. Você deixa

tudo mais alegre.

- Ao meu irmão, **Hélio Gabriel**, por ser um escape em meio à correria, por me permitir entrar no seu mundo e fugir um pouquinho da realidade.
- À minha sobrinha, **Maria Helena**, que veio para alegrar as nossas vidas em um momento tão difícil. Tudo está melhor desde que você chegou.
- Ao meu namorado, **Heitor Carrulo**, que vivenciou comigo todas as mudanças, adaptações e dificuldades desse período diferente. Por estar sempre ao meu lado me incentivando e inspirando diariamente. Agradeço todo amor, cuidado e companheirismo, você com certeza fez toda a diferença nesse momento. Obrigada por tornar minha rotina e minha vida mais leves.
- À minha sogra e sogro, **Bianca e Eduardo**, e à toda família Carrulo, por todo cuidado e amparo. Muito obrigada por me acolherem com tanto carinho.
- À amiga, **Yasmin Massi**, por fazer parte desse processo e, mesmo de longe, sempre estar presente com palavras de apoio e carinho.
- Às minhas colegas de turma, o meu MUITO OBRIGADA! Vocês tornaram tudo mais fácil e leve. Com certeza levo um pouco de cada uma de vocês.
- Minha dupla, **Beatriz Arrepia**, que muito me ajudou, pelo companheirismo e todo suporte. Você me ensinou muito sobre amizade, nossa convivência diária fez de mim uma pessoa melhor.
- À **Luana Kort Kamp**, por sua parceria, partilha, ajuda e cumplicidade, independente de hora ou dificuldade. Você é uma amiga e tanto e uma

inspiração para mim!

- À **Mariana Farias**, por ser uma incentivadora nata, por estar sempre presente disposta a ajudar e ter a sensibilidade de reconhecer quando uma palavra amiga é bem-vinda e necessária.
- À **Mariana Sancas**, por nos ensinar o perfeito equilíbrio entre sabedoria e bom humor, levo uma imensa admiração por você!
- À **Michelle Jenné**, pela amabilidade, paciência e com o seu grande coração sempre ter uma palavra de carinho.
- À **Tainá Fontes**, maravilhosa surpresa que, com sua leveza, calma, e nos enchendo de orgulho, ensinou na prática o significado de coerência, dedicação e responsabilidade.

Vocês sempre estarão presentes nas minhas lembranças mais carinhosas.

Obrigada pela amizade e companheirismo que nos fizeram chegar até aqui juntas!

- Aos meus mestres, Profs Drs:
Aline Neves, por todo ensinamento; **Andréa Gonçalves**, por ensinar que é possível sim encontrar o equilíbrio entre a vida pessoal e profissional; **Andréa Pintor**, por mostrar que você pode abraçar o mundo (o seu e o dos outros), **Glória Castro**, por todo carinho, empatia, por me ensinar a ser mais humana e a perceber como uma pessoa pode fazer a diferença na vida de muitas outras; **Laura Primo**, por sempre estar por perto descontraindo o ambiente; **Lucianne Cople Maia**, que você pode ser ágil e ao mesmo tempo cuidadosa; **Marcelo Castro**, por tornar o dia a dia mais leve, com sua irreverência e alegria; **Rogério Gleiser** por nos mostrar que sempre tem um ponto que você não está observando. Agradeço a todos os professores que

direta ou indiretamente fizeram parte dessa caminhada. Muito obrigada!

- Aos alunos do mestrado e doutorado, por todo carinho, amizade e receptividade.
- Aos funcionários **Andrea, Isabel, João Carlos, Katia Seixas, Mery, Robson e Rose**, sem vocês o Departamento de Odontopediatria não seria o mesmo.
- À **CAPES** pela bolsa de estudos concedida.

A todos que contribuíram nesta ou em outra etapa da minha vida, muito obrigada! Hoje subo mais um degrau, mas levo comigo uma bagagem que jamais deixarei pelo caminho.

RESUMO

FONTES, Gabriela Pereira. Cárie dentária e erupção dos dentes decíduos como determinantes do perfil metabólico salivar. Rio de Janeiro, 2021. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a cárie dentária e a erupção dos dentes decíduos como determinantes para os metabólitos salivares. Para responder esse objetivo, este trabalho foi subdividido em dois estudos. Para o estudo 1, foi realizada uma revisão sistemática da literatura, e foram selecionados estudos que avaliassem o perfil metabólico salivar de participantes saudáveis, com e sem cárie dentária. O estudo foi conduzido de acordo com PRISMA. Uma busca sistemática sem restrições foi realizada usando termos *MeSH* e termos livres nas bases de dados *PubMed*, *Web of Science*, *LILACS*, *Cochrane*, *Scopus* e *OpenGray* até abril de 2021. Os dados foram extraídos e a análise da qualidade metodológica realizada por meio da ferramenta *ROBINS-I* e a força das evidências analisada por meio da ferramenta *GRADE*. Os resultados demonstraram níveis alterados de diferentes metabólitos, como butirato, propionato e acetato na saliva de pacientes com cárie dentária. Sete estudos foram observacionais e um com intervenção. Seis estudos foram classificados como de baixo risco e 2 como de alto risco de viés. Dois artigos não mostraram perfis metabólicos distintos de cárie dentária e grupos de controle. Para o estudo 2, a saliva total não estimulada de crianças saudáveis, sem cárie, antes e após a erupção de dentes decíduos, foi coletada para avaliação dos metabólitos de baixo peso molecular. Participaram do estudo crianças de até 60 meses de idade da Clínica de Odontopediatria da FO-UFRJ. A saliva foi submetida à análise em Ressonância Magnética Nuclear (RMN) por espectrômetro de 400MHz obtendo espectros de ^1H e ^1H - ^1H TOCSY. A análise estatística multivariada foi realizada usando-se o programa *Metaboanalyst* e a univariada, o teste t ($p < 0,05$). O grupo antes da erupção foi composto por 26 crianças ($2,34 \pm 1,9$ meses) e o grupo após a erupção foi composto por 22 crianças ($44,85 \pm 18,1$ meses). A análise demonstrou diferença estatística entre os grupos de participantes antes e após a erupção dental. Os metabólitos acetato, N-acetil açúcar, aminobutirato, hidroxibutirato e butirato, apresentaram maior quantidade na saliva de pacientes após a erupção dental, enquanto alanina, glicerol, lactato, glicose e a região de açúcar foram encontrados em maior quantidade na saliva de pacientes antes da erupção dental. Pode-se concluir que foram observadas nos dois estudos diferenças salivares em indivíduos com cárie dentária e dentes decíduos erupcionados, quando comparados aos grupos sem cárie e sem dentes decíduos erupcionados.

Palavras-chave: Saliva, Metaboloma, Cárie dentária, Criança, Espectroscopia de Ressonância Magnética

ABSTRACT

FONTES, Gabriela Pereira. Cárie Dentária e Erupção dos Dentes Decíduos Como Determinantes do Perfil Metabolômico Salivar. Rio de Janeiro, 2021. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

The aim of the present study was to evaluate dental caries and an eruption of primary teeth as determinants of salivary metabolites. To answer this objective, this work was divided into two studies. For study 1, a systematic literature review was performed, and studies that assessed the salivary metabolomic profile of healthy participants, with and without dental caries, were selected. The study was conducted in accordance with PRISMA. An unrestricted systematic search was performed using MeSH terms and free terms in the PubMed, Web of Science, LILACS, Cochrane, Scopus and OpenGray databases until April 2021. Data were extracted and the analysis was extracted and the analysis of methodological quality was performed using ROBINS-I and the strength of evidence analyzed using the GRADE tool. The results showed altered levels of different metabolites, such as butyrate, propionate and acetate in the saliva of patients with dental caries. Set studies were observational and one with intervention. Six studies were classified as low risk and 2 as high risk of bias. Two articles do not present distinct metabolomic profiles of dental caries and control groups. For study 2, a total saliva stimulated by healthy children, without caries, before and after primary teeth eruption, was collected for evaluation of low molecular weight metabolites. Children aged up to 60 months from the Pediatric Dentistry Clinic at FO-UFRJ were included in the study. Saliva was analyzed in Nuclear Magnetic Resonance (NMR) by 400MHz spectrometer, obtaining ^1H and ^1H - ^1H TOCSY spectra. A multivariate statistical analysis was performed using the Metaboanalyst program and a univariate analysis, through the t test ($p < 0.05$). The group before teeth eruption consisted of 26 children (2.34 ± 1.9 months) and the group after teeth eruption consisted of 22 children (44.85 ± 18.1 months). Statistical analysis showed difference between the groups of participants before and after tooth eruption. The metabolites acetate, N-acetyl sugar, aminobutyrate, hydroxybutyrate and butyrate generate greater amounts in the saliva of patients after teeth eruption, while alanine, glycerol, lactate, glucose and the sugar region were found in higher levels in in patients before tooth eruption. It can be concluded that salivary differences were observed in both studies, with dental caries and erupted primary teeth, when compared to the groups without caries and without erupted teeth.

Keywords: Saliva, Metabolome, Dental Caries, Child, Magnetic Resonance Spectroscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo 1

Figure 1. Diagram flow showing the literature search.....	31
Figure 2. The quality assessment of the risk of bias of the included observational studies according to the ROBINS-I tool.....	36

Artigo 2

Figura 1A. Crianças após a erupção dental.....	52
Figura 1B. Crianças antes da erupção dental; espectros representativos dos grupos estudados.....	52
Figure 2A. PLS-DA.....	52
Figura 2B. O-PLS-DA; de espectros de RMN de 1H da saliva total de crianças antes e após da erupção dental.....	52
Figura 3. VIP scores mostrando os metabólitos responsáveis pela separação entre os grupos, pela análise multivariada.....	53
Figura 4. Dendograma demonstrando a classificação e erros de classificação entre os grupos.....	55

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1. Search strategy used in each electronic database.....	26
Table 2. Characteristics of the included studies for the qualitative analysis.....	33
Table 3. Quality of evidence for the studies comparing the salivary metabolomics of subjects with and without oral diseases.....	37

Artigo 2

Table 1. Intensidades dos metabólitos da saliva apresentadas como média (unidades arbitrárias), intervalo de confiança, região do espectro (ppm) e análise estatística da análise multivariada ¹ e análise univariada.....	54
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ceo-s	Cariado, perdido, obturado – dente decíduo
DMFT	Decayed, missing, and filled teeth
DMFS	Decayed, missing, and filled surface
FO/UFRJ	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro
GRADE	Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation
ICDAS	Caries Detection and Assessment System
IgA	Imunoglobulina A
MeSH	Medical Subject Headings
µl	Microlitro
ml	Mililitro
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis Protocols
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
O-PLS-DA	Partial least squared-discriminant analysis ortogonal
PLS-DA	Partial least squared-discriminant analysis
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TOCSY	¹ H- ¹ H total correlation

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}$ Graus

g Gravidade

$=$ Igual

\pm Mais ou menos

$>$ Maior que

$<$ Menor que

$\%$ Percentual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 PROPOSIÇÃO	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
3 DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	21
4 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA	23
4.1 Artigo 1	24
4.2 Artigo 2.....	45
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
6 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXOS	74
APENDICES.....	69

1 INTRODUÇÃO

A saliva é um biofluido complexo, de obtenção não-invasiva, composto em sua maioria por água (99%-99,5%) e de extrema importância na manutenção da homeostase bucal (Dawes et al., 1972; Silva et al., 2007; Van Steijn et al., 2002). Pode ser usada como uma ferramenta em estudos em diferentes áreas da medicina, devido à sua alta capacidade informativa (Takeda et al., 2009; Al-Tarawneh et al., 2011; Pfaffe et al., 2011; Wei et al., 2011), o que possibilita o monitoramento da concentração de uma ampla variedade de drogas, hormônios, anticorpos e outras moléculas (Silva et al., 2007). Dentre elas, observam-se os metabólitos, compostos de baixo peso molecular, presentes nos fluídos orgânicos (Daviss, 2005; Rochfort, 2005), como urina (Walsh et al., 2006), sangue (Yu et al., 2011) e saliva (Silwood et al., 2002; Fidalgo et al., 2013).

Acredita-se que o uso da saliva para a realização de testes de diagnóstico seja promissor, possibilitando determinar, antever e acompanhar o estado clínico do paciente. Desta forma, este biofluido vem sendo analisado em pesquisas acerca de uma ampla variedade de doenças tanto sistêmicas como bucais, como a cárie dentária (Fidalgo et al., 2013). Apesar da redução em sua incidência em países desenvolvidos (Organização Mundial da Saúde, 2003), a cárie dentária ainda é uma doença crônica de alta prevalência e afeta 3,5 bilhões de crianças e adultos em todo o mundo (Kassebaum et al., 2015), sendo considerada um problema de saúde pública (Kassebaum et al., 2017). A cárie, em seu conceito mais atual, caracteriza-se como uma disbiose polimicrobiana. Esse desequilíbrio entre as populações da microbiota bucal residente, frequentemente modulado por uma grande oferta de carboidratos fermentados, culmina na dissolução do substrato dental (Marsh e Bradshaw, 1995).

Nesse contexto, a composição salivar pode influenciar nas interações dinâmicas entre a superfície do esmalte e a cavidade oral (Shimizu et al., 2012). Modificações estruturais, alterações do microbioma e proteínas salivares podem ter relação com os níveis de perfil de baixo peso molecular na saliva. O perfil metabólico designa um panorama geral da fisiologia celular, através do levantamento quantitativo e qualitativo dos metabólitos presentes. A análise

metabolômica visa identificar a concentração relativa, a presença e abundância, de compostos de baixo peso molecular no biofluido estudado (Daviss, 2005; Rochfort, 2005). O conjunto de metabólitos existentes em um sistema vivo ou em uma determinada amostra é chamado de metaboloma (Tweeddale et al., 1998). Uma das formas de realizar a análise desses compostos é através da Ressonância Magnética Nuclear (RMN), um método não invasivo capaz de monitorar diferentes componentes de biofluidos e identificar moléculas estranhas às amostras biológicas (Silwood et al., 2002; Fidalgo et al., 2013).

No contexto das análises salivares, os estudos envolvendo tecnologias de identificação e mensuração de biomoléculas promoveram grande avanço em seu campo de pesquisa (Sung et al., 2012). Apesar disso, estudos que utilizam a metabolômica para análise de amostras salivares ainda são escassos quando comparados aos trabalhos que avaliam amostras sanguíneas e de urina, por exemplo. Dentro os estudos que utilizam a metabolômica, as análises salivares em condições de saúde ainda são pouco exploradas, especialmente em bebês. Sugere-se que o perfil metabolômico salivar das crianças seja distinto antes e após a erupção dos dentes decíduos, devido às alterações na composição da microbiota local, pelo desenvolvimento crescimento e variações hormonais ocorridas no organismo durante a infância (Parisotto et al., 2011).

Sabendo da necessidade de estudos com o uso da saliva como fluido diagnóstico e como forma de antever e acompanhar o estado clínico de pacientes, seja para afecções bucais ou até mesmo doenças sistêmicas (Nagler, Bahar et al. 2006; Shpitzer et al., 2007), é de grande relevância a realização de pesquisa que avalie se há diferença nos metabólitos salivares de baixo peso molecular encontrados na saliva de pacientes com e sem cárie dentária, bem como identificar o perfil do metaboloma salivar de crianças saudáveis antes e após a erupção dos dentes decíduos.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se há diferença nos metabólitos salivares de baixo peso molecular encontrados na saliva de pacientes com e sem cárie dentária, além de caracterizar o perfil metabolômico salivar de crianças antes e após a erupção dos dentes decíduos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar por meio de uma revisão sistemática da literatura se existem diferenças entre os metabólitos de baixo peso molecular salivares encontrados em participantes com e sem cárie dentária.
- Analisar o perfil metabolômico salivar através da Ressonância Magnética Nuclear de crianças sem cárie dentária nos períodos pré-dental e dentição decídua.

3 DELINEAMENTO DA PESQUISA

O primeiro estudo consiste em uma revisão sistemática conduzida de acordo com PRISMA (*Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols*). Uma busca sistemática sem restrições foi realizada por dois autores (G.P.F. e T.K.S.F.), usando termos MeSH (Medical Subject Headings) e termos livres, nas bases de dados PubMed, Web of Science, LILACS, Cochrane, Scopus e OpenGray até abril de 2020. Além disso, as listas de referências dos artigos selecionados foram pesquisadas manualmente para incluir outros artigos relevantes que não foram identificados pela estratégia de pesquisa. Estudos clínicos comparando metabólitos salivares entre pacientes sistemicamente saudáveis com e sem cárie foram incluídos na presente revisão. Os critérios adotados para elegibilidade dos estudos a serem incluídos nesta pesquisa foram definidos com base nos elementos da estratégia PECO (Maia e Antonio, 2012).

Todos os artigos identificados foram armazenados em software web (www.myendnoteweb.com). As duplicatas foram removidas para que os artigos que apareciam em mais de uma base de dados fossem considerados apenas uma vez. Os pesquisadores leram os títulos e resumos identificados em todas as bases de dados e foram obtidos os textos completos dos estudos considerados potencialmente relevantes. Sempre que houve diferenças entre os dois avaliadores, uma terceira pessoa foi consultada (L.B.F.F.). Em seguida, foram selecionados os estudos que obedeciam a todos os critérios de elegibilidade previamente estabelecidos. A análise da qualidade metodológica foi realizada por meio da ferramenta ROBINS-I para estudos observacionais e a força da evidência foi qualificada por meio da ferramenta GRADE (*Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation*).

No segundo estudo, foi realizada uma pesquisa com desenho de estudo transversal, em uma amostra de conveniência, sendo caracterizada como descritiva de abordagem quantitativa; foi avaliado o perfil metabólico salivar de crianças sem cárie antes e após a erupção dos dentes decíduos. A população estudada foi oriunda da Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRJ. Foi realizada a coleta de saliva total não estimulada de crianças

sistematicamente saudáveis (segundo relatos dos responsáveis), sem lesões bucais e/ou lesões em tecidos moles e que apresentassem Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado (Apêndice A). Os responsáveis preencheram uma ficha de anamnese (Apêndice B), contendo informações de saúde, hábitos de higiene e dieta dos participantes. Participaram do estudo crianças de 0 a 6 anos, em diferentes fases da dentição decídua, incluindo bebês edêntulos até a dentição decídua completa. Todas as crianças foram submetidas a uma avaliação clínica na qual todas as estruturas intraorais foram examinadas, sendo preenchida uma ficha de exame clínico padronizada (Apêndice C).

A coleta inicial de saliva total não estimulada foi realizada com uso de pipeta automática e ponteiros plásticos estéreis. As amostras foram armazenadas em microtubos plásticos estéreis e mantidas sob refrigeração em isopor com gelo. As amostras foram imediatamente centrifugadas e armazenadas a -80°C até o momento das demais análises. Os metabólitos salivares foram analisados através de Ressonância Magnética Nuclear com leitura executada pelo espectrômetro de 400 MHz possibilitando identificar qual ou quais compostos de baixo peso molecular são mais relevantes durante a erupção dos dentes decíduos.

4 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

4.1 Artigo 1: Alterações nos metabólitos salivares de baixo peso molecular estão relacionadas à cárie dentária? Uma revisão sistemática

Artigo em processo de submissão

4.1 Artigo 2: Perfil metabolômico salivar de crianças antes e após a erupção dos dentes decíduos

Artigo em processo de submissão

4.1 Artigo 1

Low molecular weight salivary metabolites changes are related to dental caries? A systematic review

Alterações nos metabólitos salivares de baixo peso molecular estão relacionadas à cárie dentária? Uma revisão sistemática.

Gabriela Pereira Fontes¹

Aline dos Santos Letieri¹

Liana Bastos Freitas-Fernandes¹

Ana Paula Canedo Valente²

Ivete Pomarico Ribeiro de Souza¹

Tatiana Kelly da Silva Fidalgo³

¹Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

²National Center for Nuclear Magnetic Resonance, Medical Biochemistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³Department of Preventive and Community Dentistry, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Corresponding Author:

Tatiana Kelly da Silva Fidalgo

E-mail: tatianaksfidalgo@gmail.com

Boulevard Vinte e Oito de Setembro, 157

Vila Isabel, Rio de Janeiro - RJ, 20551-030

Phone: +55 21 2569-0410

ABSTRACT

Objective: The present study aimed to assess whether there is a difference in low molecular weight salivary metabolites in patients with and without tooth decay through a systematic review. **Methods:** The study was conducted according to PRISMA. A systematic search without restrictions was performed using MeSH terms and free terms in PubMed, Web of Science, LILACS, Cochrane, Scopus, and OpenGrey databases until April 2021. Clinical studies comparing salivary metabolites between systemically healthy patients with and without caries were included in the present review. Data were extracted and the methodological quality analysis was performed using the ROBINS-I tool for observational studies and the strength of the evidence was analyzed using the GRADE tool. **Results:** The initial search retrieved 540 articles and after eligibility criteria assessment, eight studies were included. The results demonstrated changed levels of several metabolites, such as butyrate, propionate, and acetate in the saliva from patients with dental caries. The metabolomic analysis of the included studies was carried out using nuclear magnetic resonance and mass spectroscopy, as well as liquid, and gas chromatography. Seven studies were observational, and one study was interventional. Six studies were classified as low risk of bias, and two studies were classified as high risk of bias. Two articles did not show distinct metabolomic profiles from dental caries and control groups. **Conclusion:** There is very low certain of evidence of distinguishing salivary metabolite profiles between individuals with and without dental caries.

Keywords: Biomarkers, Dental Caries, Metabolome, Metabolomics, Saliva

INTRODUCTION

Dental caries, a highly prevalent chronic disease, is a dysbiosis of the oral microbiota, resulting from a change in the resident oral microbial community (Marsh and Bradshaw, 1995). The incidence of dental caries has been reduced in developed countries, but more than 530 million children still suffer from dental caries (World Health Organization, 2020). Dental caries affects a total of 3.5 billion of children and adults worldwide (Kassebaum et al., 2015), with a need for dental treatment, which has an expensive cost and is considered a public health problem (Kassebaum et al., 2017).

The composition of saliva may influence the dynamic interaction between the surface of the enamel and the oral cavity (Shimizu et al., 2012). This structural modification, microbiome and salivary protein changes have been overexplored in the literature, and these changes can have a relationship with the levels of low molecular weight profiles in saliva. Understanding these processes can help to elucidate the process of dental caries (Lenander-Lumikari and Loimaranta, 2000).

Several authors have pointed out the relationship between salivary metabolites and dental caries (Fidalgo, 2013; Fidalgo et al., 2015; Pereira et al., 2019), but on the other hand, other studies did not confirm it (Schulz, et al., 2020; Sugimoto et al., 2013). The authors that related dental caries and low molecular weight metabolites found fatty acid, propionate, acetate, and lactate in higher amounts in the saliva of children with dental caries (Fidalgo et al., 2013). This result was validated in another population (Fidalgo et al., 2015; Pereira et al., 2019). The present systematic review aimed to question if low molecular weight salivary metabolite changes are related to dental caries.

MATERIAL AND METHODS

Protocol and registration

This review adhered to the PRISMA instructional recommendations (Moher et al., 2015), and its study protocol was registered in PROSPERO (registration number CRD42020208274).

Search strategy

The electronic search was performed independently by two authors (G.P.F. and T.K.S.F.) using Medical Subject Headings (MeSH) terms and free terms related to dental caries, saliva, and salivary metabolites. All articles published before April 22, 2021, were considered for review. An individual search strategy was developed for each of the following databases: PubMed/Medline, Web of Science, Cochrane, Scopus, and LILACS/BBO without applying filters by date (Table 1). Also, gray literature was explored by the OpenGrey database. The reference lists of the selected articles were searched manually to include other relevant articles that were not identified by the search strategy.

Table 1: Search strategy used in each electronic database.

PUBMED
#1 (Saliva[MeSH Terms] OR saliva*[Title/Abstract])
#2 (Metabolomics[MeSH Terms] OR Metabolome[MeSH Terms] OR Biomarkers Tumor[MeSH Terms] OR Metabolomic*[Title/Abstract] OR Metabolome[Title/Abstract] OR Biomarkers Tumor[Title/Abstract] OR Metabolite*[Title/Abstract] OR Metabolomes[tiab] OR Metabolic Profile[tiab] OR Metabolic Profiles[tiab] OR Profile Metabolic[tiab] OR Profiles Metabolic[tiab] OR Metabonomics[tiab] OR Metabonomic[tiab] OR Marker[tiab] OR Metabolome*[tiab] OR "Metabolic Profiling"[tiab] OR "Metabolic Biomarkers"[tiab] OR "Metabolic Protraits"[tiab] OR Metabolit*[tiab] OR Metabolo*[tiab] OR Metabonom*[tiab] OR "Metabolite Network**"[tiab] OR "Metabolite Profile**"[tiab] OR "Metabolic Signature"[tiab] OR Metabolom*[tiab] OR Metabonome[tiab] OR "Mass Spectrometry"[tiab])
#3 (Dental Caries[MeSH Terms] OR Dental Decay[tiab] OR Dentins Carious[tiab] OR White Spots[tiab] OR White Spot[tiab] OR White Spot Dental[tiab] OR White Spot Lesion[tiab] OR Carie*[tiab] OR Root Caries[MeSH Terms] OR Caries Root[tiab] OR DMF Index[MeSH Terms] OR DMFT[tiab] OR DMFS[tiab])
#1 AND #2 AND #3
SCOPUS
#1 TITLE-ABS-KEY (saliva OR saliva*)
#2 TITLE-ABS-KEY ("Dental Caries" OR "Dental Decay" OR "White Spots" OR "White Spot" OR "Root Caries" OR "DMF Index" OR DMFT OR DMFS)

#3 TITLE-ABS-KEY (Metabolomics OR Metabolome OR "Biomarkers Tumor" OR Metabolomic* OR Metabolome OR Metabolite* OR Metabolomes OR "Metabolic Profile" OR "Profile Metabolic" OR Metabonomic OR Marker OR Metabolome* OR "Metabolic Profiling" OR "Metabolic Biomarkers" OR "Metabolic Protraits" OR Metabolit* OR Metabolo* OR Metabonom* OR "Metabolite Network*" OR "Metabolite Profile*" OR "Metabolic Signature" OR Metabolom* OR Metabonome OR "Mass Spectrometry")

#4 LIMIT-TO (DOCTYPE , "ar") AND (LIMIT-TO (SUBJAREA , "DENT"))

#1 AND #2 AND #3 AND #4

WEB OF SCIENCE

#1 TS=(Saliva) OR TS=(Saliva*)

#2 TS=(Dental AND Caries) OR TS=(Dental AND Decay) OR TS=(White AND Spots) OR TS=(White AND Spot) OR TS=(Root AND Caries) OR TS=(DMF AND Index) OR TS=(DMFT) OR TS=(DMFS)

#3 TS=Metabolomics) OR TS=(Metabolome) OR TS=(Biomarkers AND Tumor) OR TS=(Metabolomic*) OR TS=(Metabolome) OR TS=(Biomarkers AND Tumor) OR TS=(Metabolite*) OR TS=(Metabolomes) OR TS=(Metabolic AND Profile) OR TS=(Metabolic AND Profiles) OR TS=(Profile AND Metabolic) OR TS=(Profiles AND Metabolic) OR TS=(Metabonomics) OR TS=(Metabonomic) OR TS=(Marker) OR TS=(Metabolome)* OR TS=(Metabolic AND Profiling) OR TS=(Metabolic AND Biomarkers) OR TS=(Metabolic AND Protraits) OR TS=(Metabolit*) OR TS=(Metabolo*) OR TS=(Metabonom*) OR TS=(Metabolite AND Network*) OR TS=(Metabolite AND Profile*) OR TS=(Metabolic AND Signature) OR TS=(Metabolom*) OR TS=(Metabonome) OR TS=(Mass AND Spectrometry)

#1 AND #2 AND #3

COCHRANE LIBRARY

#1 Saliva [MeSH Terms]

#2 Saliva*

#3 #1 or #2

#4 #5 Metabolomics [MeSH Terms]

#6 #4 or #5 Metabolomic* OR Metabolite* OR Profile Metabolic OR Profiles Metabolic OR Metabonomics OR Metabonomic

#7 Metabolome [MeSH Terms]

#8 Metabolomes OR Metabolic Profile OR Metabolome* OR "Metabolic Profiling" OR "Metabolic Biomarkers" OR "Metabolic Protraits" OR "Metabolic Signature" OR Metabolom* OR Metabonome OR "Mass Spectrometry"

#9 #7 or #8

#10 "Biomarkers Tumor" [MeSH Terms]

#11 Metabolit* OR Metabolo* OR Metabonom* OR "Metabolite Network*" OR "Metabolite Profile*"

#12 #10 or #11

#13 #3 or #6 or #9 or #12

#14 Dental Caries [MeSH Terms]

#15 "Dental Decay" OR "Dentins Carious" OR "White Spots" OR "White Spot" OR "White Spot Dental" OR "White Spot Lesion" OR Carie*

#16 #14 or #15

#17 Root Caries [MeSH Terms]

#18 "Caries Root"

#19 #17 or #18

#20 DMF Index [MeSH Terms]

#21 DMFT OR DMFS

#22 #20 or #2

#23 #13 and #22

LILACS AND BBO

#1 (tw:(tw:((mh: "Dental caries" OR "dental decay" OR carie))))

#2 (tw:(tw:((mh: saliva OR saliva*)))

#3 (tw:(tw:((mh: Metabolomics OR Metabolome OR "Biomarkers Tumor"))

#4 (instance:"regional")

#5 db:("LILACS" OR "BBO"))

#6 #1 AND #2 AND #3 AND #4 AND #5

GRAY LITERATURE

#1 Metabolomics OR Metabolome OR Biomarkers Tumor

#2 "Dental Caries" OR "Dental Decay" OR "White Spots" OR "White Spot" OR "Root Caries" OR "DMF Index" OR DMFT OR DMFS

#3 Saliva

#1 AND #2 AND #3

Inclusion criteria

Clinical studies comparing salivary metabolomic profiles among patients without oral diseases and systemically healthy with the presence and absence of caries were included in the present review.

The criteria adopted for the eligibility of the studies to be included in this research were defined based on the elements of the PECO strategy (Maia and Antonio, 2012), as follows:

P (Population) - human saliva

E (Exposure) - the presence of caries

C (Comparison) - absence of caries

O (Outcome) - low molecular weight compounds using metabolomic techniques

Exclusion criteria

Case reports, reviews, abstracts, animal studies, case series, opinion articles, letters to the editor, and book chapters, as well as articles with full texts unavailable, which were not written in English, which did not correspond to the objectives of this review, and with participants with systemic diseases, were excluded. Also, studies that did not have a control group (without dental caries) or that evaluated only one of the variables studied (caries or salivary metabolites) were excluded.

Selection of studies and data collection process

All identified articles were stored in web software (www.myendnoteweb.com). Duplicates were removed so that articles that appeared in more than one database were considered only once. Two researchers read (G.P.F. and T.K.S.F.) the titles and abstracts identified in all databases, and the full texts of studies considered potentially relevant were obtained. Whenever there were differences between the two evaluators, a third person was consulted (L.B.F.F.). Then, the studies that followed all the eligibility criteria previously established were selected.

Risk of bias in individual studies

Quality assessment was performed by two individuals (G.P.F. and T.K.S.F) to determine the risk of bias. Whenever there were differences between the two evaluators, a third person was consulted (L.B.F.F.). The methodological quality analysis was performed using the ROBINS-I tool (Sterne et al., 2016) for observational studies, in which the following seven domains were analyzed: (1) Bias due to confounding, (2) Bias in selection of participants into the study, (3) Bias in classification of exposure, (4) Bias due to deviations from intended exposure, (5) Bias due to missing data, (6) Bias in measurement of the outcome and (7) Bias in selection of the reported result (Sterne et al., 2016).

The studies were considered to be at high risk of bias in the following domains: (1) Confounding factors are not controlled in the design, such as the patient having hyposalivation or any other oral disorder; (2) Selection of study participants when the sample is not representative and/or the sample calculation was not performed; (3) Classification of the group when there is a problem with exposure, a caries measurement index is not described or was not used, or even when the index used is not validated; (4) When, after the beginning of the study, differences occur in one or both groups (with and without caries), but the participant remains part of the study, which can impact the outcome; (5) Missing data when the number of patients with and without dental caries and/or the

average age of the participants was not reported; (6) Bias in the outcome assessment when unvalidated or different methods are used to assess outcomes in different intervention groups; (7) In the selection of the reported result, when there is a flight from the main objective. In each domain, articles were classified as low, unclear and high risk of bias. Each study was classified as low, moderate, and high risk of bias, being low (high or moderate risk in up to one domain), moderate (high or moderate risk in up to two domains), and high (high risk in more than two domains).

Strength of evidence

In addition to assessing the methodological quality of studies using the Robins-I tool, the Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation (GRADE) system (Guyatt et al., 2011) was used to assess the quality of the evidence. This tool provides greater reliability to the critical analysis of the findings, evaluating information about the set of studies included, such as the number of participants, the risk of bias, inconsistency, indirect, inaccuracy, and publication bias. Based on the confounders present, in addition to the summary of the findings, the studies were classified into the following four categories of quality of evidence in terms of evidence: High - There is strong confidence that the true effect/association is close to the estimated; Moderate - There is moderate confidence in the estimated effect/association; Low - Confidence in the effect/association is limited; and Very Low - Confidence in the estimation of the effect/association is extremely limited.

RESULTS

Characteristics of the articles included

Initially, 540 articles were obtained by searching six databases. After the duplicates were removed, 334 articles were considered for reading of the title and abstract. Then, 317 articles were excluded and 17 remained. The manual search

did not retrieve any additional study. After reading the full texts, eight studies (Fidalgo et al., 2013; Sugimoto et al., 2013; Foxman et al., 2014; Masoudi Rad et al., 2014; Fidalgo et al., 2015; Seredin et al., 2018; Pereira et al., 2019; Schulz et al., 2020), which met the eligibility criteria, underwent qualitative assessment as presented in the flowchart, which describes the identification process, inclusion and exclusion from the studies (Figure 1).

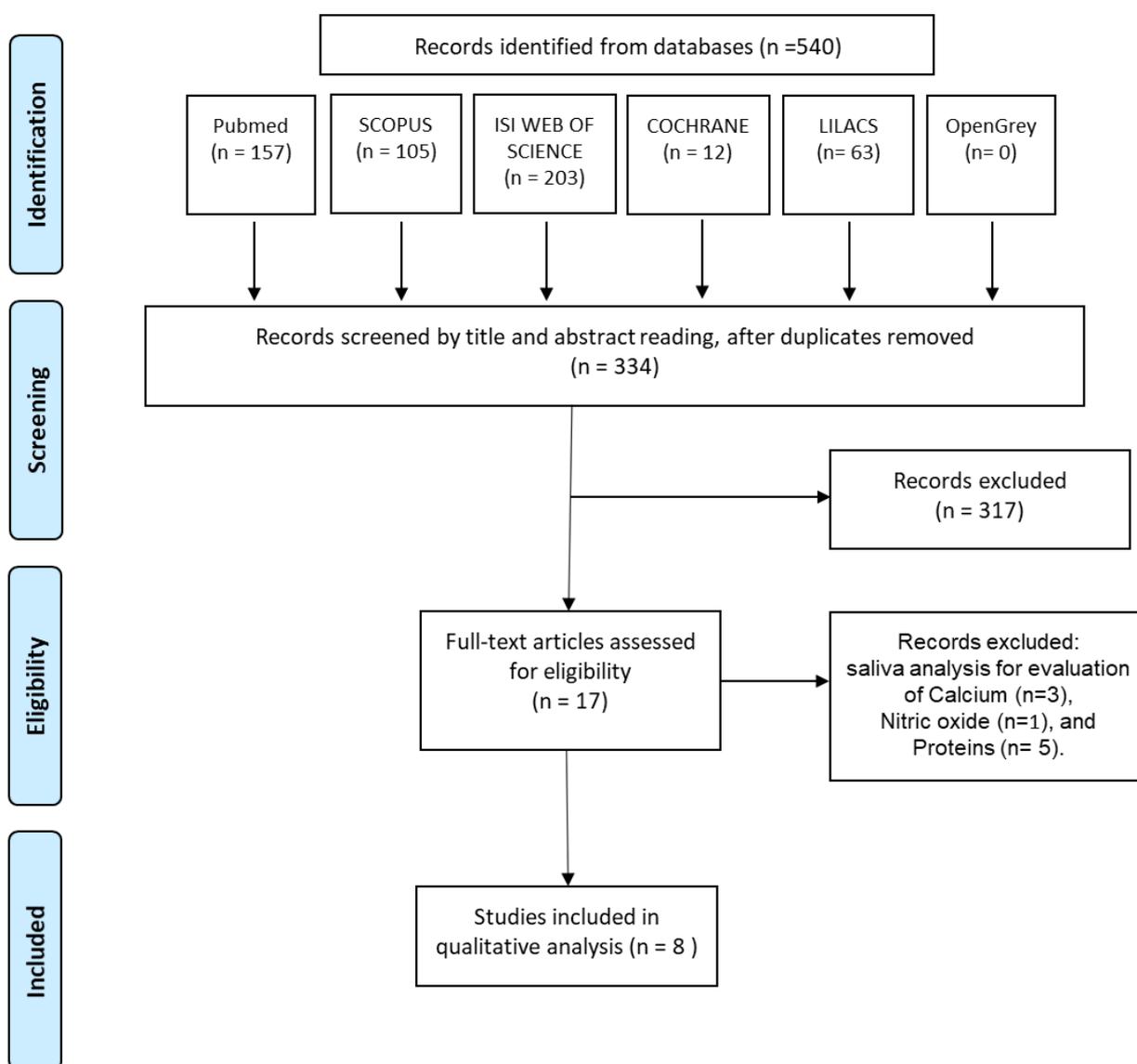


Figure 1: Literature search in the different databases.

All articles evaluated the concentration of certain salivary metabolites by correlating them to the presence and absence of dental caries. The main findings of the selected studies are shown in Table 2. From the eight articles included, seven articles were observational with a cross-sectional design and one article was interventional (Fidalgo et al., 2015), but the data were extracted before the treatment. The year of publications ranged from 2012 (Sugimoto et al., 2013) to 2020 (Schulz et al., 2020). The age of the participants and the sample size were very heterogeneous among the studies. The subjects ranged from 2 to 41 years old, and one study did not provide data on the age of the participants (Masoudi Rad et al., 2014). The majority of the included studies investigated populations of children (Fidalgo et al., 2013; Foxman et al., 2014; Fidalgo et al., 2015; Pereira et al., 2019; Schulz et al., 2020), two studies analyzed adult populations (Seredin et al., 2018; Sugimoto et al., 2013), and one did not report the population that was analyzed (Masoudi Rad et al., 2014). Regarding the number of participants, only one study performed the sample calculation but failed to reach the estimated number (Pereira et al., 2019). The number of individuals evaluated ranged from 20 (Seredin et al., 2018) to 80 (Sugimoto et al., 2013), reaching a total of 371 evaluated patients, considering the participants of all included studies.

Only one of the selected studies did not adopt a specific inclusion criterion, volunteers who agreed to provide saliva samples participated in the study, and patients with periodontal disease or glossalgia were excluded. (Sugimoto et al., 2013). The remaining articles had dental caries in the group of exposition and patients without dental caries in the control group, all subjects were systemically healthy (Fidalgo et al., 2013; Foxman et al., 2014; Masoudi Rad et al., 2014; Fidalgo et al., 2015; Pereira et al., 2019; Schulz et al., 2020). Heterogeneity was observed among the dental caries diagnostic index. The indexes used were decayed, missing, and filled teeth (DMFT) (Fidalgo et al., 2013; Sugimoto et al., 2013; Foxman et al., 2014; Masoudi Rad et al., 2014; Fidalgo et al., 2015; Schulz et al., 2020) and the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS-II) (Seredin et al., 2018), both of which were adopted in one study (Pereira et al., 2019). In addition, one study used another parameter used for this

assessment, radiography, as a complementary method for visual caries detection (Fidalgo et al., 2015).

Table 2: Characteristics of the included studies for the qualitative analysis.

Authors (year)	Sample size	Age of the participants (years)	Index used for measurement of dental caries	Altered metabolites	Analysis method	Statistic difference
Sugimoto, et al., 2013	80 participants	18 a 41	NA	Arginine, lysine	<ul style="list-style-type: none"> • Mass spectrometry • Capillary electrophoresis 	No significant correlation
Fidalgo et al., 2013	65 children	4 a 12	<ul style="list-style-type: none"> • DMFT • dmft • DMFT/dmft 	Lactate, fatty acid, acetate, butyrate, phenylalanine, and propionate	<ul style="list-style-type: none"> • Nuclear magnetic resonance 	<ul style="list-style-type: none"> • Difference was statistically significant.
Foxman et al., 2014	50 children	2 a 7,3	<ul style="list-style-type: none"> • dmft • DMFT/dmft 	Aspartate, ornithine, arginine, and proline	<ul style="list-style-type: none"> • Mass spectrometry • Liquid chromatography. 	<ul style="list-style-type: none"> • Difference was statistically significant.
Masoudi Rad, et al., 2014	31 participants	NA	<ul style="list-style-type: none"> • DMFT 	Threonine, citrulline, ornithine, serin, glutamine, and phenylalanine	<ul style="list-style-type: none"> • Liquid chromatography. 	<ul style="list-style-type: none"> • Difference was statistically significant.
Fidalgo et al., 2015	30 children	2,8 a 4,2	<ul style="list-style-type: none"> • dmft 	Acetate, propionate, fatty acid, butyrate, and saccharide	<ul style="list-style-type: none"> • Nuclear magnetic resonance 	<ul style="list-style-type: none"> • Difference was statistically significant.

Seredin, et al., 2018	20 participants	22 a 28	ICDAS	Saccharide	• Spectroscopic	• Difference was statistically significant.
Pereira, et al., 2019	38 children	4 a 16	<ul style="list-style-type: none"> • ICDAS • dmft • DMFT • DMFT/dmft 	Alanine, Aspartate, Glutamine, Glycine, Isoleucine, Leucine, Proline, Taurine, Tyrosine, Organic acids, Butyrate, Fucose, Galactose, Glucose, Xylose, Acetone, Choline, Dimethylsulfone, Hypoxanthine, Methanol, N-acetyls, Uracil	• Nuclear magnetic resonance	• Difference was statistically significant.
Schulz, et al., 2020	57 children	4 a 6	<ul style="list-style-type: none"> • dmf/t • dmf/s 	Hidroxyproline, acetate, propionate, lactate, threonine, serin	<ul style="list-style-type: none"> • Mass spectrometry • Liquid and gas chromatography 	• No significant correlation

NA = Not available

All included studies analyzed unstimulated whole saliva for low molecular weight assessment. The methods adopted for analyzing the metabolites showed great heterogeneity between the studies. Three studies carried out metabolomics analyses using a nuclear magnetic resonance (NMR) approach (Fidalgo et al., 2013; Fidalgo et al., 2015; Pereira et al., 2019), while two other studies used mass spectrometry (Sugimoto et al., 2013; Foxman et al., 2014). In the three other remaining studies, authors adopted different tools, such as spectroscopy (Seredin et al., 2018), liquid chromatography (Masoudi Rad et al., 2014), and the association between liquid and gas chromatography and mass spectrometry (Schulz et al., 2020).

The most commonly found salivary metabolites associated with dental caries were lactate (Fidalgo et al., 2013; Foxman et al., 2014; Pereira et al., 2019; Schulz et al., 2020), acetate (Sugimoto et al., 2013; Fidalgo et al., 2013; Fidalgo et al., 2015; Schulz et al., 2020), fatty acid (Fidalgo et al., 2013; Fidalgo et al., 2015; Schulz et al., 2020), and butyrate (Fidalgo et al., 2013; Fidalgo et al., 2015; Pereira et al., 2019).

In general, although two studies have not detected a statistically significant relationship between the increase of salivary metabolites with the presence of dental caries in children (Schulz et al., 2020) and adults (Sugimoto et al., 2013), six studies observed a positive relationship with a statistically significant difference (Fidalgo et al., 2013; Foxman et al., 2014; Masoudi Rad et al., 2014; Fidalgo et al., 2015; Seredin et al., 2018; Pereira et al., 2019).

Bias risk assessment

The quality assessment of included studies is exhibited in Figure 2. The general classifications of these articles ranged from low to high risk of bias. In general, the main methodological problem encountered was the selection of participants, as the sample calculation was not performed in any of included studies. Two of them had a high risk of bias because of bias in the selection of

participants, missing data, and the bias in the selection of the reported result (Masoudi Rad et al., 2014). In addition, some missed information demonstrated a lack of control over confounding factors, such as the absence of reporting of the method of measuring caries (Sugimoto et al., 2013). Six studies showed low risk, and the only methodological issue was the selection of participants (Fidalgo et al., 2013; Foxman et al., 2014; Fidalgo et al., 2015; Seredin et al., 2018; Pereira et al., 2019; Schulz et al., 2020).

	Bias to the confounding	Bias in selection of the participants into study	Bias in classification of exposition	Bias due to deviations from intended exposures	Bias due to missing data	Bias in measurement of the outcome	Bias in selection of the reported result
Fidalgo et al., 2013	+	-	+	+	+	+	+
Fidalgo et al., 2015	+	-	+	+	+	+	+
Foxman et al., 2014	+	-	+	+	+	+	+
Masoudi Rad, et al., 2014	+	-	+	+	-	-	+
Pereira, et al., 2019	+	-	+	+	+	+	+
Schulz, et al., 2020	+	-	+	+	+	+	+
Seredin, et al., 2018	-	-	?	+	+	+	+
Sugimoto, et al., 2012	-	-	+	+	+	+	+

Figure 2: The quality assessment of the risk of bias of the included observational studies according to the ROBINS-I tool.

Strength of evidence

Table 3 shows an overall low level of evidence. The included studies demonstrated great heterogeneity for the metabolites found, which gives the studies serious inconsistencies. For methodological limitations, no study performed a calculation to establish the sample size (Fidalgo et al., 2013; Sugimoto et al., 2013; Foxman et al., 2014; Masoudi Rad et al., 2014; Fidalgo et al., 2015; Seredin et al., 2018; Pereira et al., 2019; Schulz et al., 2020). Regarding the study design, one article (Masoudi Rad, et al., 2014) presented neither data referring to case and control groups nor the age of the participants, while another article (Sugimoto, et al., 2012) showed a large variation in the age of the participants, representing severe indirect evidence. This same study presented serious residual confounding factors as they were not considered potentially biasing factors; did not adopt a specific inclusion criterion; volunteers who agreed to provide saliva samples participated in the study; only patients with periodontal disease or glossalgia were excluded; and smoking, alcohol consumption, and medication use were ignored. There was also a large difference in the number of participants with dental caries and the control group (without caries). For the other parameters obtained to verify the strength of the evidence, no possible publication bias or imprecision was found.

Table 3: Quality of evidence for the studies comparing the salivary metabolomics of subjects with and without oral diseases.

Participants (studies)	Certainty assessment					Publication bias	Overall certainty of evidence	Summary of findings
	Risk of bias	Inconsistency	Indirectness	Imprecision	Impact			
252 (8 observational studies)	serious ^a	serious ^b	serious ^c	not serious	dose response gradient	⊕○○○ VERY LOW	The findings demonstrated differences between subjects with and without dental caries, however the metabolites varies.	

- CI: Confidence interval
a. Varied ages and absence of sample size
b. Heterogeneity among the metabolites
c. Surrogate outcome

DISCUSSION

The present systematic review evaluated clinical studies comparing salivary metabolomics profiles confirming that salivary metabolites differ from saliva from subjects with and without dental caries. Quality assessment was conducted according to the common Cochrane collaboration bias scheme and ROBINS-I tool (Sterne et al., 2016), initially restricted to assess non-randomized clinical trials and also currently available for observational studies. For this reason, the ROBINS-I tool was applied for the seven observational studies (Fidalgo et al., 2013; Sugimoto et al., 2013; Foxman et al., 2014; Masoudi Rad et al., 2014; Seredin et al., 2018; Pereira et al., 2019; Schulz et al., 2020) and for the interventional study (Fidalgo et al., 2015).

From the eight included studies comparing salivary metabolites from patients with and without dental caries in this systematic review, six studies demonstrated a relationship between salivary metabolites and dental caries (Fidalgo et al., 2013; Foxman et al., 2014; Masoudi Rad et al., 2014; Fidalgo et al., 2015; Seredin et al., 2018; Pereira et al., 2019). Only one of them presented a high risk of bias (Masoudi Rad et al., 2014) in the following domains: bias in the selection of participants into the study, bias to the selection of the reported result, and bias to the missing data. At least 32 metabolites of different classes were found to be significantly altered in patients with active dental caries when compared to the control group. Of these metabolites, 11 of them were confirmed in more than one study, including fatty acid, acetate, butyrate, phenylalanine, propionate, aspartate, ornithine, proline, glutamine, phenylalanine, and saccharides. Some theories for the positive correlation between dental caries and the alteration of certain salivary metabolites have been suggested. Most of them are related to bacterial metabolites. One is supported by Slomiany et al. (1989) and Tomita et al. (2008) and is based on the fact that many metabolites are

present in the region of mucus glycoproteins in the salivary film of tooth surfaces; thus, the effect of caries development by inhibiting acid diffusion increases.

Sugimoto et al. (2013) did not describe the caries method, and in addition, confounding factors, such as smoking and medication intake, were accepted in the study, which contributed to a high risk of bias in the domains of confusion and classification of exposure. Arginine and lysine were found to be slightly increased in participants with dental caries, but this finding was statistically insignificant. Schulz et al. (2020) studied saliva metabolites from young children with different caries activities, and no significant difference was found in saliva characteristics. The study had a low risk of bias.

Regarding the age of the participants, four studies evaluated only children from 2.8 to 12 years old (Fidalgo et al., 2013; Foxman et al., 2014; Fidalgo et al., 2015; Schulz et al., 2020), and among them, only one study did not find a significant correlation (Schulz et al., 2020). Regarding adolescents, no study has exclusively evaluated the age group, and only one study has evaluated children and adolescents between 4 and 16 years old, with an average age of 10 years. The research found a statistically significant difference between low molecular weight metabolites in groups with experience and the absence of dental caries (Pereira et al., 2019). Two studies evaluated adults aged 18 to 41 years (Sugimoto et al., 2013; Seredin et al., 2018). While one study found a statistically significant difference (Seredin et al., 2018), the other found no significant correlation between salivary metabolites and DMFT (Sugimoto et al., 2013). Thus, differences in caries-related metabolites were found regardless of the age of the participants. This demonstrates that dental caries result in a fingerprint metabolite in any age group.

Lactate was the most cited metabolite among the articles, but this finding had no statistical difference in the majority of studies. Although lactate is known to be related to mature biofilms due to the metabolism of the microorganism promoting tooth demineralization, these aspects need deeper exploration in the salivary metabolomics of dental caries. In addition, Aimetti et al. (2012) reported that the intake of food and beverages on the study day may interfere with the

results, considering that organic acids may originate from the diet or the activity of oral microflora, that is, from the metabolism of carbohydrates (Dame et al., 2015).

Butyrate is a metabolite that has demonstrated statistical differences in the majority of the included studies. Interestingly, reports on butyrate are controversial. While one study observed a decrease in the metabolite (Pereira et al., 2019), two other studies reported an increase (Fidalgo et al., 2013; Fidalgo et al., 2015). This increase may be the result of bacterial fermentation processes. Pereira et al. (2019) found amino acids and monosaccharides with no history of previous reports in cases of children with dental caries, suggesting hydrolysis and deglycosylation of proteins due to the activity of bacteria, in addition to hypoxanthine and dimethylsulfone, which may reflect inflammation and bacterial growth.

As a method of analyzing metabolites, the studies used NMR spectroscopy (Fidalgo et al., 2013; Fidalgo et al., 2015; Pereira et al., 2019) and mass spectrometry (EM) (Sugimoto et al., 2013; Foxman et al., 2014; Schulz et al., 2020). Despite the higher sensitivity of MS-based methods, NMR allows for simpler and faster sample preparation, which is non-destructive (that is, samples can be recovered for subsequent analysis by other methods) and provided more reproducible analyses (Emwas et al., 2013; Gil and Duarte, 2018). It is also necessary to perform perspective studies for confirming the metabolic salivary profile of dental caries.

CONCLUSION

There is very low certain of evidence regarding the relationship between tooth decay and salivary metabolic profile. The salivary metabolic signature of individuals with active caries that has been identified is consistent with bacterial metabolism and protein hydrolysis.

REFERENCES

- Aimetti, M., Cacciatore, S., Graziano, A., & Tenori, L. (2012). Metabonomic analysis of saliva reveals generalized chronic periodontitis signature. *Metabolomics*, 8(3), 465–474.
- Al-Tarawneh, S. K., Border, M. B., Dibble, C. F., & Bencharit, S. (2011). Defining salivary biomarkers using mass spectrometrybased proteomics: A systematic review. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 15(6), 353–361.
- Beaglehole R, Benzian H, Crail J, Macaky J. The Oral Health Atlas. Mapping a neglect global health issue. Brighton, UK: FDI World Dental Federation, 2009
- Bertram, H. C., Eggers, N., & Eller, N. (2009). Potential of human saliva for nuclear magnetic resonance-based metabolomics and for health-related biomarker identification. *Analytical Chemistry*, 81(21), 9188–9193.
- Brasil. Ministério da Saúde (MS). Projeto SB Brasil 2010: resultados principais. Brasília: MS; 2011.
- Cuevas-Cordoba, B., & Santiago-Garcia, J. (2014). Saliva: A Fluid of Study for OMICS. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 18(2), 87–97.
- Dame, Z. T. et al. The human saliva metabolome. *Metabolomics* 11(6), 1864–1883 (2015).
- Downer MC. The Improving Dental Health of United Kingdom Adults and Prospects for the Future. *Br Dent J* 1991; 170(4): 154-158.
- Emwas, A.-H.-M., Salek, R. M., Griffin, J. L., & Merzaban, J. (2013). NMRbased metabolomics in human disease diagnosis: Applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics*, 9, 1048–1072. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0524-y>.
- Fidalgo, T. K. S., Freitas-Fernandes, L. B., Angeli, R., Muniz, A. M. S., Gonsalves, E., Santos, R., et al. (2013). Salivary metabolite signatures of children with and without dental caries lesions. *Metabolomics*, 9(3), 657–666.
- Fidalgo, T. K. S., L. B. Freitas-Fernandes, F. C. L. Almeida, A. P. Valente and I. P. R. Souza (2015). “Longitudinal evaluation of salivary profile from children with dental caries before and after treatment.” *Metabolomics*.
- Foxman B, Srinivasan U, Wen A, Zhang L, Marrs C, Goldberg D, Weyant R, McNeil D, Crout R, Marazita M: *Infection, Genetics and Evolution* 2014; 22:201–207.
- Gil, A. M., & Duarte, D. (2018). Biofluid metabolomics in preterm birth research. *Reproductive Sciences*, 25, 967–977.

Grootveld, M., & Silwood, C. J. (2005). ¹H NMR analysis as a diagnostic probe for human saliva. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 329(1), 1–5.

Guyatt G, et al. GRADE guidelines: 1. Introduction—GRADE evidence profiles and summary of findings tables. *Journal of clinical epidemiology*, v. 64, n. 4, p. 383-394, 2011.

Hamedi, A.S., Huang, R., Zhou, Y. & Zou, J. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. *Int. J. Oral Sci.* 1–7 (2017).

Hart, T. C., P. M. Corby, et al. Identification of microbial and proteomic biomarkers in early childhood caries. *Int J Dent*, v.2011, p.196721. 2011.

Masoudi Rad H, Rabiei M, Sobhani A, Sadegh Khanjani M, Rahbar Taramsar M, Kazemnezhad Leili E. Free amino acids in stimulated and unstimulated whole saliva: advantages or disadvantages. *J Oral Rehabil.* 2014 Oct;41(10):759-67.

Kassebaum NJ, et al. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *Journal of dental research*, v. 94, n. 5, p. 650-658, 2015.

Kassebaum NJ; et al. Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990–2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. *Journal of dental research*, v. 96, n. 4, p. 380-387, 2017.

Lenander-Lumikari M, Loimaranta V. Saliva and dental caries. *Adv Dent Res* 2000;14:40–7.

Listl, S., Galloway, J., Mossey, P. A. & Marcenes, W. Global Economic Impact of Dental Diseases. *J. Dent. Res.* 94(10), 1355–1361 (2015).

Madsen, R., Lundstedt, T., & Trygg, J. (2010). Chemometrics in metabolomics—a review in human disease diagnosis. *Analytica Chimica Acta*, 659(1–2), 23–33.

Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology*. 1995;15:169–175.

Marthaler TM, O'Mullane DM, Vrbic V. The Prevalence of Dental Caries in Europe 1990-95. Symposium Report. *Caries Res* 1996; 30(4): 237-255.

Moher D, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Systematic reviews*, v. 4, n. 1, p. 1, 2015.

Nascimento, M. M., Zaura, E., Mira, A., Takahashi, N., & Ten Cate, J. M. (2017). Second era of OMICS in caries research: Moving past the phase of disillusionment. *Journal of Dental Research*, 96, 733–740.

Narvai PC, Frazão P, Roncalli AG, Antunes JLF. Cárie dentária no Brasil: declínio, polarização, iniquidade e exclusão social. *Pan Am J Public Health* 2006; 19(6): 385–93.

Navazesh M, Kumar SK. Measuring salivary flow challenges and opportunities. *J Am Dent Assoc.* 2008;139:35–40.

Ng, D. J. Y., Pasikanti, K. K., & Chan, E. C. Y. (2011). Trend analysis of metabonomics and systematic review of metabonomics-derived cancer marker metabolites. *Metabolomics*, 7(2), 155–172.

Pappa, E., Kousvelari, E., & Vastardis, H. (2018). Saliva in the “Omics” era: A promising tool in Paediatrics. *Oral Diseases*, 25, 16–25.

Pereira JL, Duarte D, Carneiro TJ, et al. Saliva NMR metabolomics: Analytical issues in pediatric oral health research. *Oral Dis.* 2019;00:1–10.

Petersen PE, et al. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 83, p. 661-669, 2005.

Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. *Arch Oral Biol.* 2007;52:1114–1135.

Seredin P, Goloshchapov D, Ippolitov Y, Vongsvivut P. Pathology-specific molecular profiles of saliva in patients with multiple dental caries-potential application for predictive, preventive and personalised medical services. *EPMA J.* 2018 Apr 25;9(2):195-203.

Shimizu T, Ho B, Deeley K, et al. Enamel formation genes influence enamel microhardness before and after cariogenic challenge. *PloS One.* 2012;7(9):e45022.

Silwood, C. J., Lynch, E. J., Seddon, S., Sheerin, A., Claxson, A. W., & Grootveld, M. C. (1999). ¹H-NMR analysis of microbial-derived organic acids in primary root carious lesions and saliva. *NMR in Biomedicine*, 12(6), 345–356.

Slomiany, B. L., Murty, V. L., Mandel, I. D., Zalesna, G., & Slomiany, A. (1989). Physico-chemical characteristics of mucus glycoproteins and lipids of the human oral mucosal mucus coat in relation to caries susceptibility. *Archives of Oral Biology*, 34(4), 229–237.

Sterne JAC, Hernán MA, Reeves BC, et al. The Risk Of Bias In Non-randomized Studies – of Interventions (ROBINS-I) assessment tool ROBINS-I tool (Stage I): At protocol stage ROBINS-I tool (Stage II): For each study Specify a target randomized trial specific to the study. *BMJ.* 2016;355:i4919.

Streckfus, C. F., Bigler, L. R., & Zwick, M. (2006). The use of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to detect putative breast cancer markers in saliva: A feasibility study. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 35(5), 292–300.

Schulz, A., Lang, R., Behr, J. et al. Metabômica direcionada da película e da saliva em crianças com diferentes atividades de cárie. *Sci Rep* 10, 697 (2020).

Sugimoto, M. et al. Physiological and environmental parameters associated with mass spectrometry-based salivary metabolomic profiles. *Metabolomics* 9(2), 454–463 (2013).

Sugimoto, M., Wong, D. T., Hirayama, A., Soga, T., & Tomita, M. (2010). Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancerspecific profiles. *Metabolomics*, 6(1), 78–95.

Takeda, I., Stretch, C., Barnaby, P., Bhatnager, K., Rankin, K., Fu, H., et al. (2009). Understanding the human salivary metabolome. *NMR in Biomedicine*, 22(6), 577–584.

Tomita, Y., Miyake, N., & Yamanaka, S. (2008). Lipids in human parotid saliva with regard to caries experience. *Journal of Oleo Science*, 57(2), 115–121.

Van Nieuw Amerongen, A., Bolscher, J. G. M., & Veerman, E. C. I. (2004). Salivary proteins: Protective and diagnostic value in cariology? *Caries Research*, 38, 247–253.

Van Steijn GJ, Amerongen AV, Veerman EC, Kasanmoentalib S, Overdijk B: Effect of periodontal treatment on the activity of chitinase in whole saliva of periodontitis patients. *J Periodontal Res* 2002; 37:245-249.

Wong DT. *Salivary Diagnostic*. New Delhi, India: Wiley-Blackwell; 2008:37–59.

World Health Organization. *The World Oral Health Report*. Geneva: WHO, 2003.

4.2 Artigo 2

Perfil metabólico salivar de crianças antes e após a erupção dos dentes decíduos

Gabriela Pereira Fontes¹

Liana Bastos Freitas-Fernandes¹

Aline dos Santos Letieri¹

Ana Paula Canedo Valente²

Ivete Pomarico Ribeiro de Souza¹

Tatiana Kelly da Silva Fidalgo³

¹Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

²National Center for Nuclear Magnetic Resonance, Medical Biochemistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³Department of Preventive and Community Dentistry, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Corresponding Authors:

Dr. Ana Paula Valente, Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear, Bioquímica Médica, Cidade Universitária – CCS, CEP: 21.941-590 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil, Phone: + 55 21 2566789. E-mail: valente.anap@gmail.com

Dr. Ivete Pomarico Ribeiro de Souza, Disciplina de Odontopediatria da FO-UFRJ, Cidade Universitária – CCS, CEP: 21941-971 – Rio de Janeiro – RJ – Brazil, Phone: + 55 21 25622101. E-mail: pomarico@gmail.com

RESUMO

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi identificar o perfil metabólico salivar de crianças saudáveis antes e após a erupção dos dentes decíduos. **Material e Métodos:** Foram selecionadas crianças antes e após a erupção dental em dentição decídua. Todas as crianças foram submetidas a uma avaliação clínica na qual todas as estruturas intraorais foram examinadas, sendo preenchida uma ficha de exame clínico padronizada e termo de consentimento assinado. Foi realizada a coleta da saliva total não estimulada de bebês com e sem dentes decíduos erupcionados e em seguida centrifugadas a 10.000 g por -4°C e estocada em -80°C. Os metabólitos salivares foram analisados através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) utilizando um espectrômetro de 400 MHz, obtendo espectros ^1H para a análise e ^1H - ^1H TOCSY para assinalamentos dos metabólitos que foram coletados à 25°C. Foi realizada análise multivariada usando método discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA), PLS-DA ortogonal (O-PLS-DA) e análise univariada por meio do teste t (SPSS 20.0, IL, EUA), adotando-se um intervalo de confiança de 95%. **Resultados:** O grupo de crianças antes da erupção dental foi composto por 26 crianças, sendo 57,69% (n = 15) meninas, com idade média de $2,34 \pm 1,9$ meses, e o grupo após da erupção foi composto por 22 crianças, sendo 72,72% meninas, com idade média foi de $44,85 \pm 18,1$ meses. A análise mostrou perfil metabólico salivar distinto quando comparado o grupo de crianças antes e após da erupção dental. Os metabólitos acetato, N-acetil açúcar, aminobutirato, hidroxibutirato e butirato apresentaram maior quantidade na saliva de pacientes após da erupção. Por outro lado, alanina, glicerol, lactato, glicose e a região de açúcar foram encontrados em maior quantidade na saliva de pacientes antes da erupção dental **Conclusão:** A saliva dos bebês antes da erupção dos dentes decíduos apresenta diferença no perfil metabólitos em relação a dos bebês com dentes. Sugere-se que mudanças fisiológicas podem ocorrer com o crescimento das crianças e em decorrência da erupção dental.

Palavras-chave: Metaboloma, Metabolitos, Saliva, Crianças, Ressonância Magnética Nuclear.

INTRODUÇÃO

A saliva é um biofluido complexo, com inúmeros compostos biológicos que apresentam alta capacidade informativa (Freitas-Fernandes et al 1998; Takeda et al., 2009; Al-Tarawneh et al., 2011; Pfaffe et al., 2011; Wei et al., 2011). Dentre eles, destacam-se os compostos de baixo peso molecular, denominados metabólitos. Por se tratar de componentes de reações da fisiologia celular, os metabólitos permitem estabelecer o perfil metabólico dos organismos (Davis, 2005; Rochfort, 2005).

A análise dos metabólitos pode ser realizada através da Ressonância Magnética Nuclear (RMN), um método não invasivo capaz de monitorar diferentes componentes de biofluidos e identificar moléculas estranhas às amostras biológicas (Silwood et al., 2002; Fidalgo et al., 2013). A saliva foi utilizada em diferentes áreas da medicina para avaliar e monitorar doenças sistêmicas (Nagler et al., 2006; Shpitzer et al., 2007 Freitas-Fernandes et al. 2020), e é de extrema relevância nos estudos de metabolômica para compreensão dos mecanismos bioquímicos que envolvem as doenças. Nesse sentido, foi descrito o perfil de metabólitos de baixo peso molecular de crianças com e sem cárie na dentição decídua, mista e permanente (Fidalgo, Freitas-Fernandes et al. 2013, Fidalgo, Freitas-Fernandes et al. 2015), porém os metabolitos salivares são pouco explorados em bebês (Letieri et al 2021).

Também foi elucidado na dentição decídua as condições bucais após o tratamento restaurador dos dentes afetado pela cárie, sendo demonstrado que o tratamento dos dentes promovia um reequilíbrio na flora bacteriana bucal e nos metabólitos, mas não era capaz de reestabelecer a condição dos pacientes observada antes do surgimento da doença (Fidalgo, Freitas-Fernandes et al. 2015). Entretanto, até o presente momento, ainda é desconhecida a evolução desses metabólitos ao longo do tempo em condições de saúde. Conhecer o perfil normal de metabólitos salivares endógenos é fundamental para identificar os metabólitos relacionados às alterações fisiológicas, especialmente em bebês. Durante esse período, observa-se o desenvolvimento das glândulas salivares, que só atingem seu grau completo de

maturação com aproximadamente 4 anos de idade (Saito et al., 2008). Além disso, sabe-se que, durante primeiros anos de vida, há uma mudança e um aumento significativo na diversidade de espécies microbianas que colonizam a cavidade bucal (Holgerson et al., 2015), que também podem ser responsáveis por alterar a composição salivar.

Somado a isso, Fidalgo et al. (2015) observaram alterações em componentes como acetato, butirato, propionato, dentre outros, em pacientes com cárie. Esses achados corroboram com os achados de Silwood et al. (1999) e Pereira et al. (2019). Apesar dos trabalhos sugerirem que tais componentes sejam provenientes do metabolismo de microrganismos bucais, ainda não há comprovação científica para tal afirmação.

Sugere-se que o perfil metabólico salivar das crianças seja distinto antes e após a erupção dos dentes decíduos, devido às alterações na composição da microbiota local, pelo desenvolvimento e maturação das glândulas salivares que ocorrem durante a infância (Pyati, Naveen Kumar et al. 2018, Saitou, Gaylord et al. 2020). Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar o perfil metabólico salivar antes e após a erupção dos dentes decíduos, através da Ressonância Magnética Nuclear.

MATERIAL E METODOS

Sujeitos da pesquisa

Participaram deste estudo transversal crianças antes e após a erupção de dentes decíduos, em dentição decídua, até 6 anos de idade, que fossem sistematicamente saudáveis, de acordo com relato dos responsáveis, em dentição decídua, sem cárie dentária, sem lesões bucais e/ou lesões em tecidos moles e que apresentem Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado. A coleta foi realizada na Clínica de Odontopediatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ. Os responsáveis preencheram uma ficha desenvolvida para o estudo com dados pessoais, anamnese, informações de saúde e hábitos de higiene e dieta dos participantes. Em seguida, um profissional

treinado realizou o exame clínico de todas as estruturas intraorais das crianças, registrando os dados na ficha de exame clínico. Para o exame intraoral foi utilizado espelho bucal e afastador de língua descartável. O exame clínico dos bebês era realizado com dedos enluvados no colo da mãe. O protocolo do estudo e o uso de material humano foram autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Número do parecer: 3.050.625).

Coleta e armazenamento das amostras de saliva

As amostras foram coletadas no período entre 8:00 e 10:00 horas, devido ao ciclo circadiano da saliva (Dawes, 1972). Foi realizada a coleta da saliva total não estimulada dos participantes (1 mL) por meio de pipeta automática com pontas estéreis, sendo armazenada em tubos de plástico estéreis (ependorfs) em gelo e realizada a centrifugação a 10.000 g, a 4° C, durante 1 h no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa da Faculdade de Odontologia UFRJ. O sobrenadante foi armazenado a -80° C até o momento das análises.

Preparo das amostras para Ressonância Magnética Nuclear (RMN), aquisição e análise dos dados

As análises de Ressonância Magnética Nuclear foram realizadas no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear – Jiri Jonas da UFRJ em um espectrômetro de 400 MHz e as soluções analisadas por RMN de hidrogênio (¹H) com sequência de pulso Carl-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG).

Para cada tubo de RMN foi inserida uma mistura de 450 µl de sobrenadante de saliva dos respectivos sujeitos além de 50 µl D₂O (água deuterada) e 10 µl DSS (4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid) a 20 mM, que atua como referência interna de deslocamento químico. (Silwood et al., 2002; Fidalgo et al., 2013). As aquisições dos espectros foram realizadas de forma padronizada, sendo pré-estabelecido o número de scans (1024 scans) e

o ganho do receptor, calculado o tempo do pulso e a relação sinal/ruído. A sequência de pulso CPMG foi utilizada a 298K.

Os dados foram submetidos a correção e alinhamento de base no programa Topspin Bruker Biospin ®, Rheinstetten, Alemanha). Experimentos de correlação total de ^1H - ^1H (TOCSY) também foram conduzidos com parâmetros de aquisição de 2.048 x 256 pontos complexos, uma largura espectral de 12.019 Hz em cada dimensão e um tempo de mistura de 70 ms (Fidalgo, Freitas-Fernandes et al., 2013, Fidalgo, Freitas-Fernandes et al., 2015) para auxílio no assinalamento. Os espectros e regiões espectrais que não puderam ser corrigidos quanto a fase e linha de base foram excluídos das análises. A estratégia de assinalamento incluiu o uso do *Human Metabolome database* (<http://www.hmdb.ca/>) e assinalamentos prévios na literatura (Fidalgo, Freitas-Fernandes et al. 2013, Fidalgo, Freitas-Fernandes et al., 2015). Os experimentos TOCSY foram usados para confirmar os assinalamentos.

Análise Estatística

Foi utilizado o Programa Estatístico SPSS 20.0 para armazenamento e análise dos demais dados obtidos, aplicando-se testes de normalidade e estipulando-se um grau de significância estatística de 95% nos demais testes a serem utilizados.

Os espectros referentes aos dados de metabolômica foram submetidos ao programa AMIX (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemanha) para extração de dados. Inicialmente, os espectros foram divididos em buckets de 0,03 ppm e a região da água e adjacente a ela removida (4,5 – 5,5 ppm) para eliminação de interferências no espectro. Apesar da quantidade de componentes dos fluidos não se alterarem, existem evidências da variação da relação quantidade de água por quantidade de componentes. Para que este fato não interferisse na avaliação através da Análise dos Componentes Principais (ACP), os valores de cada pico dos espectros foram normalizados, dividindo-se este pela soma das intensidades dos sinais de uma região dos respectivos espectros.

Os buckets gerados foram submetidos às análises multivariadas através do programa Metaboanalyst 3.0 (www.metaboanalyst.ca). O Metaboanalyst 3.0 também foi utilizado para obter o desempenho preditivo dos modelos; cada modelo foi avaliado para Q2 e R2 e precisão (ACC) para fins de validação cruzada (van Velzen, Westerhuis et al., 2008). Foi aplicada a análise discriminante com método de mínimos quadrados parcial (PLS-DA) e análise discriminante por projeções ortogonais a mínimos quadrados parciais (O-PLS-DA). A determinação dos componentes que mais contribuíram para a separação entre os grupos relacionados a presença ou não de dentes foi realizada pela análise dos VIPs scores (Xia, Sinelnikov et al., 2015). Foi realizada uma análise por dendrograma. Para a análise univariada, os dados foram submetidos ao teste t, adotando-se um intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

A análise mostrou que o perfil metabolômico salivar apresenta diferença estatisticamente significativa entre os grupos de participantes com e sem dentes decíduos erupcionados. O grupo de crianças sem dentes erupcionados foi composto por 26 crianças, sendo 57,69% (n = 15) meninas, com idade média de $2,34 \pm 1,9$ meses, variando de 25 dias a 7 meses. O grupo com dentes erupcionados foi composto por 22 crianças, sendo 72,72% meninas, com idade média foi de $44,85 \pm 18,1$ meses, variando de 9 a 60 meses.

A Figura 1 ilustra o perfil de metabólitos (0.50 – 4.50 ppm) de crianças com e sem dentes decíduos erupcionados (Figura 1, Figura 1B, respectivamente), demonstrando diferenças entre os grupos. Análises multivariadas foram realizadas para avaliar as diferenças de metabólitos em amostras de crianças sem e com dentes. As Figuras 2A e 2B mostram o PLS-DA e O-PLS-DA, respectivamente, de amostras de saliva dos dois grupos de crianças, demonstrando diferenças entre os grupos. O modelo apresentou acurácia e predição satisfatórias quando considerados 3 componentes principais (ACC = 0,86, R2 = 0,74, Q2 = 0,48). Considerando-se os dois primeiros

componentes principais (PC1 e PC2), o PLS-DA apresentou uma variabilidade de 35,0% (Figura 2A) e o O-PLS-DA de 33,2% (Figura 2B).

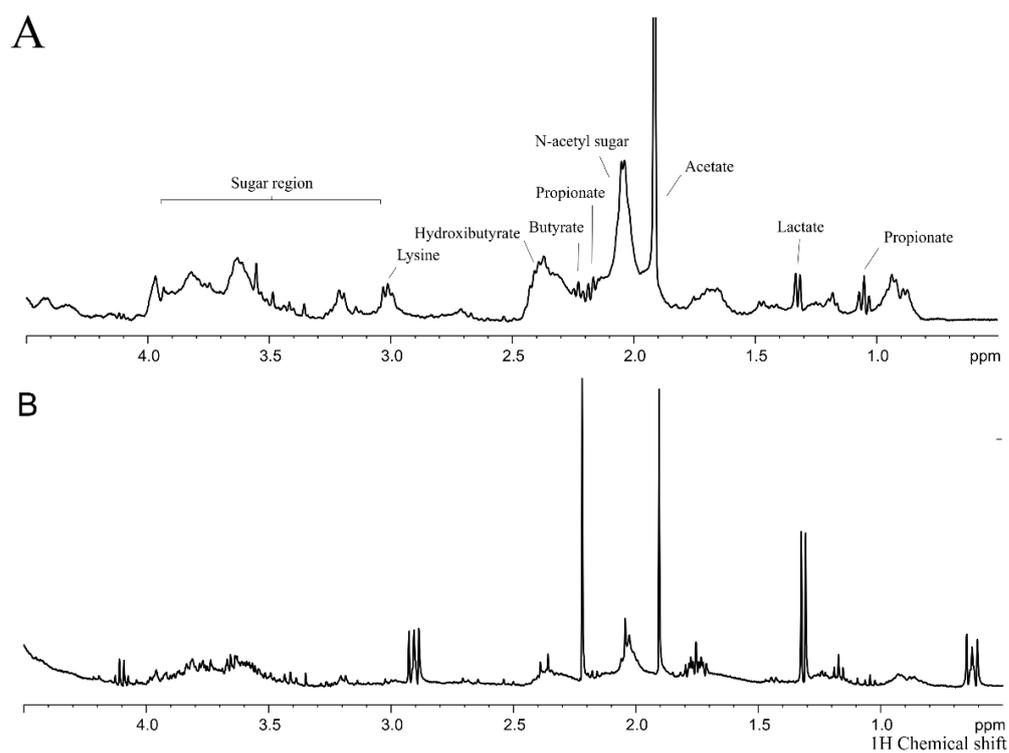


Figura 1: A- Crianças após a erupção dental; B- Crianças antes da erupção dental; espectros representativos dos grupos estudados.

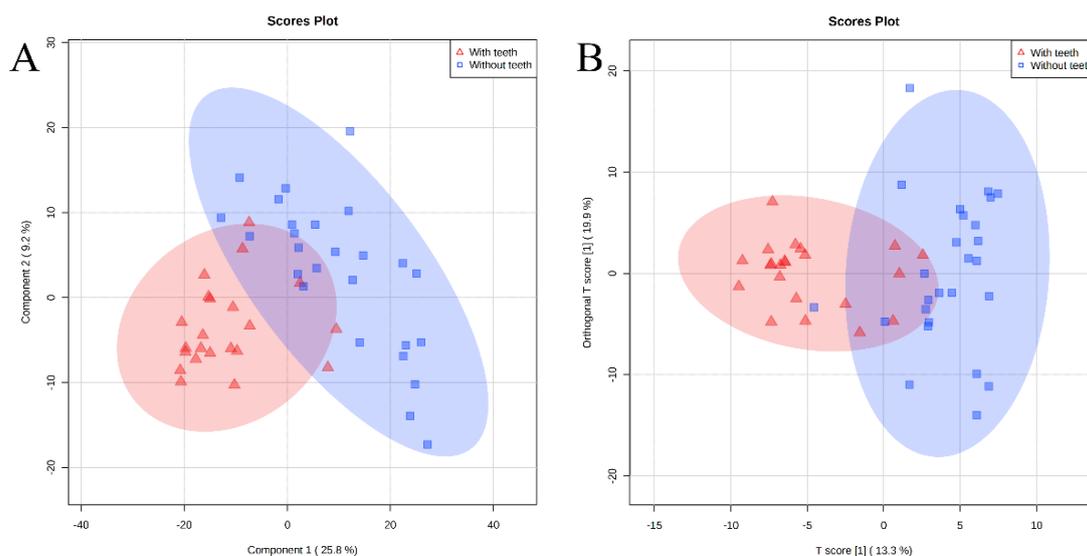


Figura 2: A- PLS-DA; B- O-PLS-DA; de espectros de RMN de 1H da saliva total de crianças antes e após da erupção dental.

A Figura 3 apresenta os VIP scores que foram gerados a partir da análise multivariada, demonstrando quais os dez metabólitos mais relevantes para separação entre os grupos.

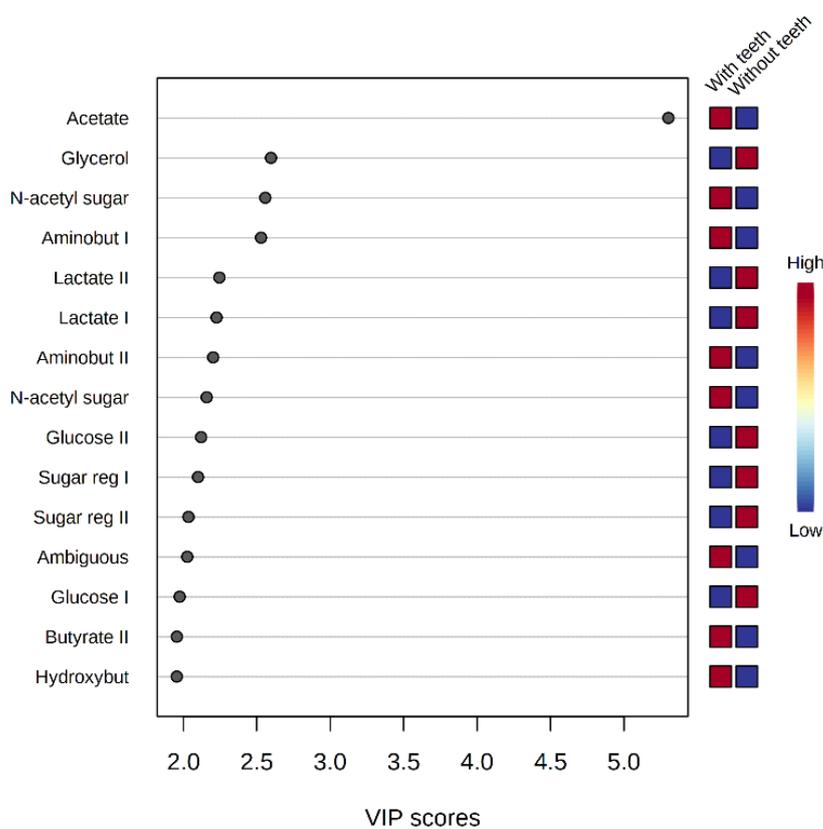


Figura 3: VIP scores mostrando os metabólitos responsáveis pela separação entre os grupos, pela análise multivariada.

A maior pontuação do VIP score demonstra que metabólito foi o mais importante para a separação entre os grupos. Dessa forma, o acetato, N-acetil açúcar, aminobutirato, hidroxibutirato e butirato apresentaram maior quantidades na saliva de pacientes com dentes. Por outro lado, alanina, glicerol, lactato, glicose e a região de açúcar foram encontrados em maior quantidade na saliva de pacientes sem dentes erupcionados.

A Tabela 1 mostra os metabólitos salivares, deslocamento químico, variação de intensidade de pico e valores de p. A tabela 1 também mostra os metabólitos que foram significativamente diferentes nas análises multivariada e univariada. Além dos metabólitos encontrados nos VIP scores, outros 5 apresentaram diferença estatística na análise univariada.

Tabela 1: Intensidades dos metabólitos da saliva apresentadas como média (unidades arbitrárias), intervalo de confiança, região do espectro (ppm) e análise estatística da análise multivariada¹ e análise univariada.²

Metabolites	Chemical shift	Without teeth Mean (95%CI)	With teeth Mean (95%CI)	p-value
Acetate ^{1,2}	1.92	59.4 x 10 ⁻⁴ (4.2x 10 ⁻⁴ – 659.3 x 10 ⁻⁴)	293.6 x 10 ⁻⁴ (31.3 x 10 ⁻⁴ – 2527 x 10 ⁻⁴)	<0.001
Aminobutyrate ^{1,2}	1.88	44.2 x 10 ⁻⁴ (1.0 10 ⁻⁴ – 134 x 10 ⁻⁴)	86.9 x 10 ⁻⁴ (11.6 x 10 ⁻⁴ – 1847x 10 ⁻⁴)	0.02
Aminobutyrate ^{1,2}	2.29	44.2 x 10 ⁻⁴ (7.7 10 ⁻⁴ – 134.35 x 10 ⁻⁴)	121.2 x 10 ⁻⁴ (33.0 x 10 ⁻⁴ – 159.5 x 10 ⁻⁴)	<0.001
Butyrate I ²	1.58	16.2 x 10 ⁻⁴ (6.9 x 10 ⁻⁴ – 85.2 x 10 ⁻⁴)	37.2 x 10 ⁻⁴ (0.6 x 10 ⁻⁴ – 114 x 10 ⁻⁴)	<0.001
Caproate ²	1.56	14.5 x 10 ⁻⁴ (8.1 x 10 ⁻⁴ – 63.5 x 10 ⁻⁴)	27.3 x 10 ⁻⁴ (9.2x 10 ⁻⁴ – 64.1 x 10 ⁻⁴)	<0.001
Saturated fatty acid ²	1.53	15.0 x 10 ⁻⁴ (8.1 x 10 ⁻⁴ – 59.0 x 10 ⁻⁴)	32.0 x 10 ⁻⁴ (13.0 x 10 ⁻⁴ – 70.4 x 10 ⁻⁴)	<0.001
Butyrate II ^{1,2}	2.36	58.4 x 10 ⁻⁴ (11.45 x 10 ⁻⁴ – 186.7 x 10 ⁻⁴)	154.2 x 10 ⁻⁴ (35.8 x 10 ⁻⁴ – 236.1 x 10 ⁻⁴)	<0.001
Glucose I ^{1,2}	3.74	223.8 x 10 ⁻⁴ (48.63 x 10 ⁻⁴ – 629.1 x 10 ⁻⁴)	146.3 x 10 ⁻⁴ (90.6 x 10 ⁻⁴ – 370.4 x 10 ⁻⁴)	0.01
Glucose II ^{1,2}	5.22	76.5 x 10 ⁻⁴ (0.6 x 10 ⁻⁴ – 782.84 x 10 ⁻⁴)	31.0 x 10 ⁻⁴ (3.3 x 10 ⁻⁴ – 232.2 x 10 ⁻⁴)	<0.001

Hydroxybutirate ^{1,2}	2.34	68.4×10^{-4} ($13.4 \times 10^{-4} - 185.1 \times 10^{-4}$)	137.5×10^{-4} ($38.7 \times 10^{-4} - 188.1 \times 10^{-4}$)	<0.001
Lactate I ^{1,2}	1.32	210.5×10^{-4} ($37.6 \times 10^{-4} - 564.8.3 \times 10^{-4}$)	97.1×10^{-4} ($12.1 \times 10^{-4} - 445.4 \times 10^{-4}$)	<0.001
Lactate II ^{1,2}	1.29	170.8×10^{-4} ($33.7 \times 10^{-4} - 590.0 \times 10^{-4}$)	67.4×10^{-4} ($23.8 \times 10^{-4} - 235.7 \times 10^{-4}$)	<0.001
Lysine ²	3.01	21.5×10^{-4} ($4.6 \times 10^{-4} - 84.6 \times 10^{-4}$)	62.4×10^{-4} ($12.2 \times 10^{-4} - 148.2 \times 10^{-4}$)	<0.001
N-acetyl sugar ^{1,2}	2.02	67.3×10^{-4} ($19.4 \times 10^{-4} - 166.9 \times 10^{-4}$)	148.0×10^{-4} ($48.3 \times 10^{-4} - 370.0 \times 10^{-4}$)	<0.001
Alanine ²	3.80	217.9×10^{-4} ($47.2 \times 10^{-4} - 646.9 \times 10^{-4}$)	129.7×10^{-4} ($82.4 \times 10^{-4} - 411.1 \times 10^{-4}$)	0.02
Propionate I ²	2.17	39.2×10^{-4} ($6.0 \times 10^{-4} - 239.5 \times 10^{-4}$)	99.7×10^{-4} ($23.8 \times 10^{-4} - 175.9 \times 10^{-4}$)	< 0.05
Propionate II ²	1.04	12.8×10^{-4} ($3.6 \times 10^{-4} - 147.3 \times 10^{-4}$)	43.5×10^{-4} ($6.8 \times 10^{-4} - 186.2 \times 10^{-4}$)	< 0.05
Glycerol ^{1,2}	3.63	279.7×10^{-4} ($72.1 \times 10^{-4} - 2031.8 \times 10^{-4}$)	170.8×10^{-4} ($69.2 \times 10^{-4} - 412.7 \times 10^{-4}$)	0.02
Sugar region I ^{1,2}	3.67	259.5×10^{-4} ($58.7 \times 10^{-4} - 968.0 \times 10^{-4}$)	147.4×10^{-4} ($79.6 \times 10^{-4} - 435.2 \times 10^{-4}$)	0.01
Sugar region II ^{1,2}	3.73	231.0×10^{-4} ($31.3 \times 10^{-4} - 629.0 \times 10^{-4}$)	117.9×10^{-4} ($69.3 \times 10^{-4} - 366.8 \times 10^{-4}$)	<0.001

Foi realizado o teste t ($p < 0,05$) para as comparações pareadas (com e sem dente). IC = intervalo de confiança; ¹metabólito da análise multivariada e ²metabólito da análise univariada.

O dendograma é um diagrama de árvore que exhibe os grupos formados por agrupamento de observações em cada passo e em seus níveis de similaridade. O Dendograma (Figura 4) apresentou boa classificação. No grupo sem dente, houve erro de classificação de 5 crianças e no grupo com dente, de 3 crianças.

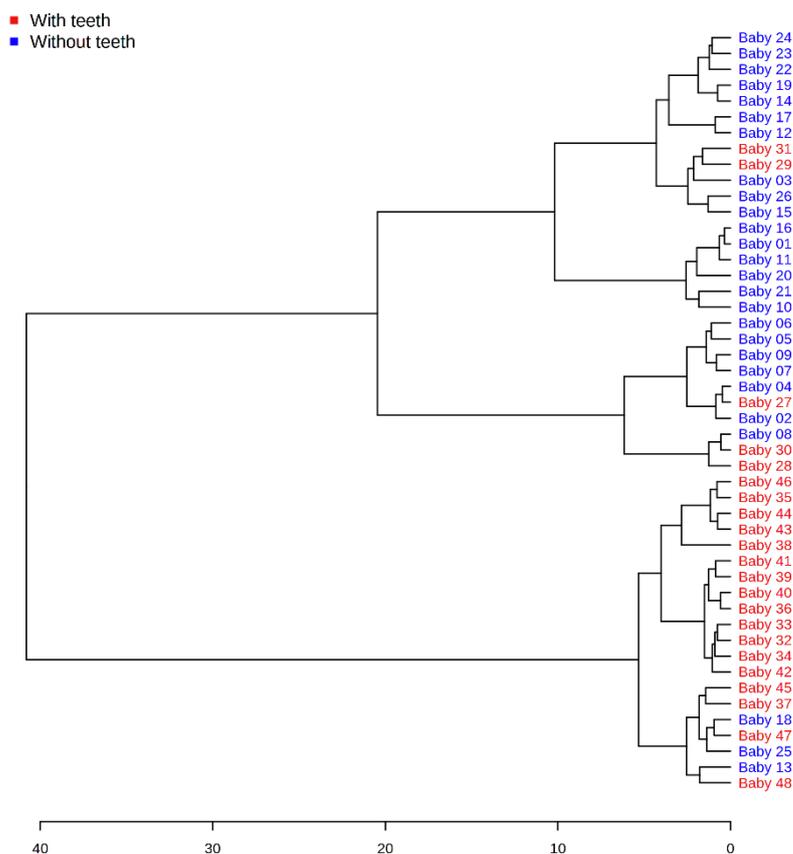


Figura 4: Dendrograma demonstrando a classificação e erros de classificação entre os grupos.

DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que o perfil metabólico salivar apresenta diferença estatisticamente significativa entre os grupos de participantes com e sem dentes decíduos erupcionados, sendo o acetato, N-acetil açúcar, aminobutirato, hidroxibutirato e butirato encontrados em maior quantidade no grupo de pacientes com dentes, pela análise multivariada. Por outro lado, glicerol, lactato, glicose e a região de açúcar foram encontrados em maior quantidade na saliva de pacientes sem dentes erupcionados. De uma forma geral, considerando-se sistemas biológicos, houve separação entre os grupos e

a análise do dendrograma demonstrou alto índice de acerto ao classificar os indivíduos de cada grupo.

A associação do processo fisiológico natural da erupção da dentição decídua com manifestações locais e gerais tem sido relatada (Fogel et al., 2004). O aumento do fluxo salivar é uma das manifestações frequentemente encontradas em crianças na fase de erupção dos primeiros dentes decíduos, entretanto ainda não existe um consenso na literatura a respeito de alterações observadas na composição salivar durante este período (Rezende et al., 2010). Existem muitas variáveis de difícil controle que representam dificuldades nos estudos que envolvem essa temática (Hulland et al., 2000). Apesar disso, essas alterações podem ser justificadas devido a diversos fatores que correlacionam a saliva e seus componentes ao crescimento e desenvolvimento normal da criança, como a maturação e início da função das glândulas salivares que ocorrem nesse período, além de mudanças inflamatórias locais provenientes do processo de erupção (Everhart et al., 1982, Parisotto et al., 2011). Nesse sentido, a metabolômica traz importantes informações acerca de mudanças que ocorrem em condições de saúde e doença (Deja et al., 2013; Fidalgo et al., 2013; Takeda et al., 2009).

Já foi observado que os níveis de IgA secretora aumentam com a idade, em crianças que estavam iniciando a transição da dentição mista. O processo de crescimento observado poderia estar ligado à maturação das glândulas salivares como parte do desenvolvimento geral dos sistemas do corpo (Parisotto, King et al., 2011). Porém, segundo Everhart (1982), a maioria dos lactentes já apresenta IgA secretora por volta das quatro semanas de idade, e esta tende a aumentar com a idade, portanto, as alterações metabolômicas observadas na erupção dos dentes decíduos no presente estudo também podem resultar em parte do processo normal de crescimento.

Morzell et al. (2011) descreveram as mudanças nos perfis de proteínas salivares em lactentes com idades entre 3 e 6 meses, avaliando o impacto da erupção dentária e introdução de alimentos sólidos em tais perfis. Foram observadas modificações substanciais nos perfis salivares. A erupção dos

dentos e a dieta também afetaram as mudanças na abundância de algumas proteínas, revelando interações dinâmicas entre o proteoma da saliva, a fisiologia oral e a dieta.

Corroborando com as afirmações, Fidalgo et al. (2013) utilizaram a abordagem metabolômica para analisar saliva de indivíduos com diferentes estágios de dentição, e encontraram níveis aumentados de acetato, sacarídeos e propionato na dentição permanente. Para avaliar o impacto das diferenças relacionadas à idade, os indivíduos foram divididos em grupos de dentição decídua, mista e permanente. A hipótese era que as variações hormonais alterariam as composições de metabólitos na saliva de crianças com idades diferentes. Foi obtido um perfil muito semelhante para todas as crianças saudáveis investigadas, porém acetato, sacarídeos e propionato foram identificados em maiores concentrações na saliva das crianças com dentições permanentes, em comparação com as crianças com dentição decídua. A diferença encontrada parece estar relacionada com o número de superfícies dentárias disponíveis na dentição permanente em relação à dentição decídua, favorecendo assim mais microrganismos e biofilme.

Não foi encontrado no presente estudo diferenças importantes com relação aos metabólitos e ao tipo de alimentação ou higiene dos participantes intragrupo. A alimentação das crianças dentro dos dois grupos variou entre amamentação exclusiva, uso de fórmulas e alimentos, sem haver qualquer relação significativa dos metabólitos alterados entre os grupos e diferença na ingestão de alimentos ou tipo de amamentação. No entanto, as análises multivariadas referentes a análise do perfil de metabólitos mostram dois grupos homogêneos. Uma maior intensidade referente a região de açúcares foi encontrada em crianças antes da erupção dental. Os açúcares, como a sacarose, são provenientes de fontes externas. Assim, sugere-se que a diferença entre a alimentação desses grupos, especialmente da ingestão de sacarídeos possa ter contribuído para a diferença de intensidade desse componente entre os grupos, especialmente em crianças mais jovens que se encontravam em período de aleitamento, sendo ele materno exclusivo ou

através da complementação, em que muitas vezes esses restos de alimentos podiam estar presentes na coleta (Pereira et al., 2019).

O acetato, encontrado no presente estudo aumentado em crianças com dentes decíduos erupcionados, também foi encontrado em maior número na dentição permanente por Fidalgo, Freitas-Fernandes et al. (2013). Este metabólito é um composto formado pelo metabolismo bacteriano e capaz de reduzir o pH, aumentando a porosidade da matriz do biofilme dentário, porém também é um metabólito encontrado em maior quantidade em amostras de saliva de pacientes com cárie dentária (Fidalgo, Freitas-Fernandes et al. 2013). O N-acetil açúcar é um produto microbiano que também foi encontrado em maior quantidade na saliva de crianças após a erupção dental. Esse metabólito é derivado amida do monossacarídeo glicose, sendo uma amida secundária entre a glucosamina e o ácido acético.

De forma semelhante, o butirato e propionato são metabólitos que estão relacionados ao metabolismo bacteriano e são capazes de reduzir o pH e alterar a população microbiana do microambiente dental (Van Houte, Russo et al., 1989; Silwood, Lynch et al., 2002). Esses metabólitos encontraram-se em maior quantidade em crianças após a erupção dental, e sugere-se que com o surgimento do substrato dental, haja um aumento de superfícies de contato que propiciam um aumento do número da microbiota bucal, conseqüentemente, dos seus produtos. Em relação ao lactato, que se apresentou em maior quantidade em crianças antes da erupção dental, também é um metabólito que pode ser resultante do produto da microbiota bucal que está presente mesmo no período pré-dental (Wan, Seow et al., 2001; Wan, Seow et al., 2003). Embora não tenha sido alvo do presente estudo, devido a diferença dos produtos microbianos encontrados na saliva de crianças antes e após a erupção, sugere-se que a microbiota também seja distinta, uma vez que os produtos microbianos em cada grupo foram diferentes.

Esses achados são extremamente importantes e demonstram a necessidade da determinação de um perfil metabolômico salivar de crianças saudáveis e sem cárie de acordo com a faixa etária e fase de erupção dentária.

A elucidação do perfil de metabólitos de crianças saudáveis em diferentes estágios de erupção dos dentes possibilita a realização de estudos em diferentes áreas da medicina para a avaliação e monitoramento de diversos tipos de doenças, tanto bucais como sistêmicas (Nagler, Bahar et al., 2006) Shpitzer et al., 2007).

CONCLUSÃO

Os dados apresentados demonstram que o perfil metabólico salivar difere entre os grupos de participantes com e sem dentes decíduos erupcionados. Os metabólitos acetato, N-acetil açúcar, aminobutirato, hidroxibutirato e butirato foram encontrados em maior quantidade no grupo de pacientes com dentes, enquanto glicerol, lactato, glicose e a região de açúcar foram encontrados em maior quantidade na saliva de pacientes sem dentes erupcionados.

REFERÊNCIAS

Al-Tarawneh, S. K., Border, M. B., Dibble, C. F., & Bencharit, S. (2011). Defining salivary biomarkers using mass spectrometrybased proteomics: A systematic review. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 15(6), 353–361.

Daviss B: Growing pains for metabolomics. *The Scientist* 2005;19:25-28.

Deja S, Barg E, Mlynarz P, Basiak A, Willak-Janc E: 1h nmr-based metabolomics studies of urine reveal differences between type 1 diabetic patients with high and low hbac1 values. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2013;83:43-48.

Everhart DL, Bamgboye PO, Schwartz MS: Salivary anti- *Streptococcus mutans* changes over a six-month period in children ages two-five years. *J Dent Res* 1982; 61: 386–390

Fidalgo, T. K. S., L. B. Freitas-Fernandes, F. C. L. Almeida, A. P. Valente and I. P. R. Souza (2015). "Longitudinal evaluation of salivary profile from children with dental caries before and after treatment." *Metabolomics*.

Fidalgo, T. K. S., L. B. Freitas-Fernandes, R. Angeli, A. M. S. Muniz, E. Gonsalves, R. Santos, J. Nadal, F. C. L. Almeida, A. P. Valente and I. P. R. Souza

(2013). "Salivary metabolite signatures of children with and without dental caries lesions." *Metabolomics* 9(3): 657-666.

Fogel CG. Signos y síntomas atribuidos a la erupción dentaria en los niños. Una aproximación histórica. *Arch. Argent Pediatr.* 2004;102:185-9. Pfafe et al., 2011;

Freitas-Fernandes LB, Rundegren J, Arnebrant T, Glantz PO. Delmopinol hydrochloride- and chlorhexidine digluconate-induced precipitation of salivary proteins of different molecular weights. *Acta Odontol Scand.* 1998 Feb;56(1):2-8.

Freitas-Fernandes, L.B., Fidalgo, T.K.S., de Almeida, P.A. et al. Salivary metabolome of children and adolescents under peritoneal dialysis. *Clin Oral Invest* 25, 2345–2351 (2021)

Hulland SA, Lucas JO, Wake MA, Hesketh KD. Eruption of the primary dentition in human infants: a prospective descriptive study. *Pediatr Dent.* 2000;22:415-21.

Holgerson PL, Öhman C, Rönnlund A, Johansson I. Maturation of oral microbiota in children with or without dental caries. *PLoS ONE.* (2015) 10:e0128534.

Letieri AS, Freitas-Fernandes LB, Albarello LL, Fontes GP, de Souza IPR, Valente AP and Fidalgo TKS (2021) Analysis of Salivary Metabolites by Nuclear Magnetic Resonance Before and After Oral Mucosa Cleaning of Infants in the Pre-dental Period. *Front. Dent. Med.* 2:667365

Morzel M, Palicki O, Chabanet C, Lucchi G, Ducoroy P, Chambon C, Nicklaus S. Saliva electrophoretic protein profiles in infants: changes with age and impact of teeth eruption and diet transition. *Arch Oral Biol.* 2011 Jul;56(7):634-42.

Nagler, R., G. Bahar, T. Shpitzer and R. Feinmesser (2006). "Concomitant analysis of salivary tumor markers--a new diagnostic tool for oral cancer." *Clin Cancer Res* 12(13): 3979-3984.

Parisotto, T. M., W. F. King, C. Duque, R. O. Mattos-Graner, C. Steiner-Oliveira, M. Nobre-Dos-Santos and D. J. Smith (2011). "Immunological and microbiologic changes during caries development in young children." *Caries Res* 45(4): 377-385.

Pyati, S. A., R. Naveen Kumar, V. Kumar, N. H. Praveen Kumar and K. M. Parveen Reddy (2018). "Salivary Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Total Protein, Oxidative Stress and Antioxidant Capacity in Children with and without Dental Caries." *J Clin Pediatr Dent* 42(6): 445-449.

Pereira JL, Duarte D, Carneiro TJ, et al. Saliva NMR metabolomics: Analytical issues in pediatric oral health research. *Oral Dis.* 2019;00:1–10

Rezende CFM, Kuhn E. Percepção das mães e pediatras de Ponta Grossa/PR em relação às alterações ocorridas em bebês durante a erupção da dentição decídua. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr.* 2010;10:163-7.

Rochfort S: Metabolomics reviewed: A new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. *Journal of natural products* 2005;68:1813-1820.

Saito N, Bauer C M, Jara H, Sakai O. Early Maturation and Temporal Evolution of the Human Salivary Glands: A T2 and Secular-T2 Multispectral Quantitative-MRI Analysis. *Radiological Society of North America 2008 Scientific Assembly and Annual Meeting, February 18 - February 20, 2008 ,Chicago IL.*

Saitou, M., E. A. Gaylord, E. Xu, A. J. May, L. Neznanova, S. Nathan, A. Grawe, J. Chang, W. Ryan, S. Ruhl, S. M. Knox and O. Gokcumen (2020). "Functional Specialization of Human Salivary Glands and Origins of Proteins Intrinsic to Human Saliva." *Cell Rep* 33(7): 108402.

Shpitzer T, Bahar G, Feinmesser R, Nagler RM: A comprehensive salivary analysis for oral cancer diagnosis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133:613-617.

Silwood, C. J., E. Lynch, A. W. Claxson and M. C. Grootveld (2002). "1H and (13)C NMR spectroscopic analysis of human saliva." *J Dent Res* 81(6): 422-427.

Takeda, I., Stretch, C., Barnaby, P., Bhatnager, K., Rankin, K., Fu, H., et al. (2009). Understanding the human salivary metabolome. *NMR in Biomedicine*, 22(6), 577–584.

Van Houte, J., J. Russo and K. S. Probst (1989). "Increased pH-lowering ability of *Streptococcus mutans* cell masses associated with extracellular glucan-rich matrix material and the mechanisms involved." *J Dent Res* 68(3): 451-459.

van Velzen, E. J., J. A. Westerhuis, J. P. van Duynhoven, F. A. van Dorsten, H. C. Hoefsloot, D. M. Jacobs, S. Smit, R. Draijer, C. I. Kroner and A. K. Smilde (2008). "Multilevel data analysis of a crossover designed human nutritional intervention study." *J Proteome Res* 7(10): 4483-4491.

Wan, A. K., W. K. Seow, D. M. Purdie, P. S. Bird, L. J. Walsh and D. I. Tudehope (2001). "Oral colonization of *Streptococcus mutans* in six-month-old preerupted infants." *J Dent Res* 80(12): 2060-2065.

Wan, A. K., W. K. Seow, D. M. Purdie, P. S. Bird, L. J. Walsh and D. I. Tudehope (2003). "A longitudinal study of *Streptococcus mutans* colonization in infants after tooth eruption." *J Dent Res* 82(7): 504-508.

Xia, J., I. V. Sinelnikov, B. Han and D. S. Wishart (2015). "MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful." *Nucleic Acids Res* 43(W1): W251-257.

Wei, J., Xie, G., Zhou, Z., Shi, P., Qiu, Y., Zheng, X., et al. (2011). Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia. *International Journal of Cancer*, 129(9), 2207–2217.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou diferenças entre componentes salivares de indivíduos com e sem cárie. Também foi demonstrado que crianças após a erupção dos dentes decíduos apresentam mudança na concentração de determinados metabólitos.

A fim de avaliar quais metabólitos seriam distintos em pacientes com e sem cárie dentária, foi realizada uma revisão sistemática da literatura. Com base nos resultados da revisão, pode-se concluir que a cárie parece afetar o perfil metabólico da saliva com níveis alterados de vários metabólitos, como butirato, propionato e acetato. O perfil metabólico salivar de indivíduos com cárie ativa é consistente com o metabolismo bacteriano e a hidrólise de proteínas.

Em relação à erupção dos dentes decíduos, também foi observado alteração no perfil metabólico salivar antes e após a erupção. Diversos autores já haviam relatado alterações proteicas, como a IgA e até mesmo de metabólitos salivares em fase de erupção dos dentes permanentes, e corroborando com os dados encontrados, o presente estudo também encontrou alteração em metabólitos relacionados à erupção dos dentes decíduos. Sugere-se que essas mudanças estejam relacionadas a fatores fisiológicos que ocorrem durante o desenvolvimento infantil, como a maturação das glândulas salivares e presença de estruturas dentárias (Fidalgo, Freitas-Fernandes et al., 2013; Parisotto, King et al. 2011).

Nossos resultados reforçam a necessidade e a relevância de investigações com o uso da saliva como fluido diagnóstico e como forma de antever e acompanhar o estado clínico de pacientes, seja para afecções bucais ou até mesmo doenças sistêmicas (Nagler, Bahar et al. 2006; Shpitzer et al., 2007). Porém, uma grande limitante nos estudos sobre saliva e na sua aplicabilidade clínica para fins de monitoramento de doenças é a complexidade deste biofluido, por se tratar de uma mistura complexa de componentes derivados de várias fontes. Além das três glândulas salivares maiores, há inúmeras menores, além de produtos exógenos, como restos de alimentos e produtos de microrganismos. Além disso, a saliva contém proteínas extrínsecas

que se originam em outros sistemas, como a corrente sanguínea (Ruhl, 2012; Yan et al., 2009). Por esta razão, novos estudos que elucidem essas questões fazem-se necessários. O presente estudo apontou o conjunto de metabólitos em condição de saúde bucal e sistêmica de crianças, população pouco explorada em estudos de metabolômica, abrindo novas perspectivas nessa área do conhecimento.

Dessa forma, podemos observar a importância dos achados do presente estudo e perceber a necessidade da determinação de um perfil metabolômico salivar de crianças e adultos saudáveis e sem cárie. A elucidação do perfil destes metabólitos possibilita o avanço na realização de estudos em diferentes áreas da medicina para ultrapassar as barreiras que dificultam pesquisas com a aplicabilidade da saliva.

6 CONCLUSÕES

Foi observado que há diferença nos metabólitos salivares de baixo peso molecular encontrados na saliva de pacientes com e sem cárie dentária, além de alteração no perfil metabólico salivar de crianças antes e após a erupção dos dentes decíduos.

- Pôde ser observado evidência muito baixa de que pacientes com cárie apresentam diferentes perfis metabólicos saliva quando comparado aos pacientes sem cárie. Metabólitos como o butirato, propionato e acetato apresentam-se aumentados em pacientes com cárie dentária.
- Pacientes antes da erupção dental apresentam padrões distintos de metabólitos salivares quando comparado a pacientes que possuem dentes decíduos erupcionados. O acetato, N-acetil açúcar, aminobutirato, hidroxibutirato e butirato apresentaram maior quantidade na saliva de pacientes com dentes, enquanto alanina, glicerol, lactato, glicose e a região de açúcar foram encontrados em maior quantidade na saliva de pacientes sem dentes decíduos erupcionados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aimetti, M., Cacciatore, S., Graziano, A., & Tenori, L. (2012). Metabonomic analysis of saliva reveals generalized chronic periodontitis signature. *Metabolomics*, 8(3), 465–474.

Al-Tarawneh, S. K., Border, M. B., Dibble, C. F., & Bencharit, S. (2011). Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: A systematic review. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 15(6), 353–361.

Beaglehole R, Benzian H, Crail J, Macaky J. The Oral Health Atlas. Mapping a neglect global health issue. Brighton, UK: FDI World Dental Federation, 2009

Bertram, H. C., Eggers, N., & Eller, N. (2009). Potential of human saliva for nuclear magnetic resonance-based metabolomics and for health-related biomarker identification. *Analytical Chemistry*, 81(21), 9188–9193.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). Projeto SB Brasil 2010: resultados principais. Brasília: MS; 2011.

Cuevas-Cordoba, B., & Santiago-Garcia, J. (2014). Saliva: A Fluid of Study for OMICS. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 18(2), 87–97.

Dame, Z. T. et al. The human saliva metabolome. *Metabolomics* 11(6), 1864–1883 (2015).

Daviss B: Growing pains for metabolomics. *The Scientist* 2005;19:25-28.

Deja S, Barg E, Mlynarz P, Basiak A, Willak-Janc E: 1h nmr-based metabolomics studies of urine reveal differences between type 1 diabetic patients with high and low hbac1 values. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2013;83:43-48.

Downer MC. The Improving Dental Health of United Kingdom Adults and Prospects for the Future. *Br Dent J* 1991; 170(4): 154-158.

Emwas, A.-H.-M., Salek, R. M., Griffin, J. L., & Merzaban, J. (2013). NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: Applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics*, 9, 1048–1072. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0524-y>.

Everhart DL, Bamgboye PO, Schwartz MS: Salivary anti- *Streptococcus mutans* changes over a six-month period in children ages two-five years. *J Dent Res* 1982; 61: 386–390

Fidalgo, T. K. S., L. B. Freitas-Fernandes, F. C. L. Almeida, A. P. Valente and I. P. R. Souza (2015). "Longitudinal evaluation of salivary profile from children with dental caries before and after treatment." *Metabolomics*.

Fidalgo, T. K. S., L. B. Freitas-Fernandes, R. Angeli, A. M. S. Muniz, E. Gonsalves, R. Santos, J. Nadal, F. C. L. Almeida, A. P. Valente and I. P. R. Souza (2013). "Salivary metabolite signatures of children with and without dental caries lesions." *Metabolomics* 9(3): 657-666.

Fogel CG. Signos y síntomas atribuidos a la erupción dentaria en los niños. Una aproximación histórica. *Arch. Argent Pediatr.* 2004;102:185-9. Pfaffe et al., 2011;

Freitas-Fernandes LB, Rundegren J, Arnebrant T, Glantz PO. Delmopinol hydrochloride- and chlorhexidine digluconate-induced precipitation of salivary proteins of different molecular weights. *Acta Odontol Scand.* 1998 Feb;56(1):2-8.

Freitas-Fernandes, L.B., Fidalgo, T.K.S., de Almeida, P.A. et al. Salivary metabolome of children and adolescents under peritoneal dialysis. *Clin Oral Invest* 25, 2345–2351 (2021)

Gil, A. M., & Duarte, D. (2018). Biofluid metabolomics in preterm birth research. *Reproductive Sciences*, 25, 967–977. <https://doi.org/10.1177/1933719118756748>

Grootveld, M., & Silwood, C. J. (2005). ¹H NMR analysis as a diagnostic probe for human saliva. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 329(1), 1–5.

Hamed, A.S., Huang, R., Zhou, Y. & Zou, J. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. *Int. J. Oral Sci.* 1–7 (2017).

Hart, T. C., P. M. Corby, et al. Identification of microbial and proteomic biomarkers in early childhood caries. *Int J Dent*, v.2011, p.196721. 2011.

Hulland SA, Lucas JO, Wake MA, Hesketh KD. Eruption of the primary dentition in human infants: a prospective descriptive study. *Pediatr Dent.* 2000;22:415-21.

Holgerson PL, Öhman C, Rönnlund A, Johansson I. Maturation of oral microbiota in children with or without dental caries. *PLoS ONE.* (2015) 10:e0128534.

Kassebaum NJ, et al. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *Journal of dental research*, v. 94, n. 5, p. 650-658, 2015.

Kassebaum NJ; et al. Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990–2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. *Journal of dental research*, v. 96, n. 4, p. 380-387, 2017.

Lenander-Lumikari M, Loimaranta V. Saliva and dental caries. *Adv Dent Res* 2000;14:40–7.

Letieri AS, Freitas-Fernandes LB, Albarello LL, Fontes GP, de Souza IPR, Valente AP and Fidalgo TKS (2021) Analysis of Salivary Metabolites by Nuclear Magnetic Resonance Before and After Oral Mucosa Cleaning of Infants in the Pre-dental Period. *Front. Dent. Med.* 2:667365.

Listl, S., Galloway, J., Mossey, P. A. & Marcenes, W. Global Economic Impact of Dental Diseases. *J. Dent. Res.* 94(10), 1355–1361 (2015).

Madsen, R., Lundstedt, T., & Trygg, J. (2010). Chemometrics in metabolomics—a review in human disease diagnosis. *Analytica Chimica Acta*, 659(1–2), 23–33.

Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology*. 1995;15:169–175. [PubMed: 8519474]

Marthaler TM, O'Mullane DM, Vrbic V. The Prevalence of Dental Caries in Europe 1990-95. Symposium Report. *Caries Res* 1996; 30(4): 237-255.

Moher D, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Systematic reviews*, v. 4, n. 1, p. 1, 2015.

Morzell M, Palicki O, Chabanet C, Lucchi G, Ducoroy P, Chambon C, Nicklaus S. Saliva electrophoretic protein profiles in infants: changes with age and impact of teeth eruption and diet transition. *Arch Oral Biol*. 2011 Jul;56(7):634-42.

Nagler, R., G. Bahar, T. Shpitzer and R. Feinmesser (2006). "Concomitant analysis of salivary tumor markers--a new diagnostic tool for oral cancer." *Clin Cancer Res* 12(13): 3979-3984.

Ng, D. J. Y., Pasikanti, K. K., & Chan, E. C. Y. (2011). Trend analysis of metabonomics and systematic review of metabonomics-derived cancer marker metabolites. *Metabolomics*, 7(2), 155–172.

Nascimento, M. M., Zaura, E., Mira, A., Takahashi, N., & Ten Cate, J. M. (2017). Second era of OMICS in caries research: Moving past the phase of disillusionment. *Journal of Dental Research*, 96, 733–740.

Narvai PC, Frazão P, Roncalli AG, Antunes JLF. Cárie dentária no Brasil: declínio, polarização, iniquidade e exclusão social. *Pan Am J Public Health* 2006; 19(6): 385–93.

Navazesh M, Kumar SK. Measuring salivary flow challenges and opportunities. *J Am Dent Assoc*. 2008;139:35–40.

Pappa, E., Kousvelari, E., & Vastardis, H. (2018). Saliva in the “Omics” era: A promising tool in Paediatrics. *Oral Diseases*, 25, 16–25.

Parisotto, T. M., W. F. King, C. Duque, R. O. Mattos-Graner, C. Steiner-Oliveira, M. Nobre-Dos-Santos and D. J. Smith (2011). "Immunological and microbiologic changes during caries development in young children." *Caries Res* 45(4): 377-385.

Pereira JL, Duarte D, Carneiro TJ, et al. Saliva NMR metabolomics: Analytical issues in pediatric oral health research. *Oral Dis*. 2019;00:1–10

Petersen PE, et al. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 83, p. 661-669, 2005.

Pyati, S. A., R. Naveen Kumar, V. Kumar, N. H. Praveen Kumar and K. M. Parveen Reddy (2018). "Salivary Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Total Protein, Oxidative Stress and Antioxidant Capacity in Children with and without Dental Caries." *J Clin Pediatr Dent* 42(6): 445-449.

Rezende CFM, Kuhn E. Percepção das mães e pediatras de Ponta Grossa/PR em relação às alterações ocorridas em bebês durante a erupção da dentição decídua. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr.* 2010;10:163-7.

Rochfort S: Metabolomics reviewed: A new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. *Journal of natural products* 2005;68:1813-1820.

Saito N, Bauer C M, Jara H, Sakai O. Early Maturation and Temporal Evolution of the Human Salivary Glands: A T2 and Secular-T2 Multispectral Quantitative-MRI Analysis. *Radiological Society of North America 2008 Scientific Assembly and Annual Meeting, February 18 - February 20, 2008 ,Chicago IL.*

Saitou, M., E. A. Gaylord, E. Xu, A. J. May, L. Neznanova, S. Nathan, A. Grawe, J. Chang, W. Ryan, S. Ruhl, S. M. Knox and O. Gokcumen (2020). "Functional Specialization of Human Salivary Glands and Origins of Proteins Intrinsic to Human Saliva." *Cell Rep* 33(7): 108402.

Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH. Saliva as research material: biochemical, physiochemical and practical aspects. *Arch Oral Biol.* 2007;52:1114–1135.

Schulz, A., Lang, R., Behr, J. et al. Metabômica direcionada da película e da saliva em crianças com diferentes atividades de cárie. *Sci Rep* 10, 697 (2020).

Shimizu T, Ho B, Deeley K, et al. Enamel formation genes influence enamel microhardness before and after cariogenic challenge. *PLoS One.* 2012;7(9):e45022. doi:10.1371/journal.pone.0045022.

Shpitzer T, Bahar G, Feinmesser R, Nagler RM: A comprehensive salivary analysis for oral cancer diagnosis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133:613-617.

Silwood, C. J., Lynch, E. J., Seddon, S., Sheerin, A., Claxson, A. W., & Grootveld, M. C. (1999). ¹H-NMR analysis of microbial-derived organic acids in primary root carious lesions and saliva. *NMR in Biomedicine*, 12(6), 345–356.

Silwood, C. J., E. Lynch, A. W. Claxson and M. C. Grootveld (2002). "¹H and (¹³C NMR spectroscopic analysis of human saliva." *J Dent Res* 81(6): 422-427.

Slomiany, B. L., Murty, V. L., Mandel, I. D., Zalesna, G., & Slomiany, A. (1989). Physico-chemical characteristics of mucus glycoproteins and lipids of the human oral mucosal mucus coat in relation to caries susceptibility. *Archives of Oral Biology*, 34(4), 229–237.

Sterne JAC, Hernán MA, Reeves BC, et al. The Risk Of Bias In Non-randomized Studies – of Interventions (ROBINS-I) assessment tool ROBINS-I tool (Stage I

): At protocol stage ROBINS-I tool (Stage II): For each study Specify a target randomized trial specific to the study. *BMJ*. 2016;355:i4919.

Streckfus, C. F., Bigler, L. R., & Zwick, M. (2006). The use of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to detect putative breast cancer markers in saliva: A feasibility study. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 35(5), 292–300.

Sugimoto, M. et al. Physiological and environmental parameters associated with mass spectrometry-based salivary metabolomic profiles. *Metabolomics* 9(2), 454–463 (2013).

Sugimoto, M., Wong, D. T., Hirayama, A., Soga, T., & Tomita, M. (2010). Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancerspecific profiles. *Metabolomics*, 6(1), 78–95.

Takeda, I., Stretch, C., Barnaby, P., Bhatnager, K., Rankin, K., Fu, H., et al. (2009). Understanding the human salivary metabolome. *NMR in Biomedicine*, 22(6), 577–584.

Tomita, Y., Miyake, N., & Yamanaka, S. (2008). Lipids in human parotid saliva with regard to caries experience. *Journal of Oleo Science*, 57(2), 115–121.

Van Houte, J., J. Russo and K. S. Probst (1989). "Increased pH-lowering ability of *Streptococcus mutans* cell masses associated with extracellular glucan-rich matrix material and the mechanisms involved." *J Dent Res* 68(3): 451-459.

van Nieuw Amerongen, A., Bolscher, J. G. M., & Veerman, E. C. I. (2004). Salivary proteins: Protective and diagnostic value in cariology? *Caries Research*, 38, 247–253.

Van Steijn GJ, Amerongen AV, Veerman EC, Kabanjoentalib S, Overdijk B: Effect of periodontal treatment on the activity of chitinase in whole saliva of periodontitis patients. *J Periodontal Res* 2002; 37:245-249.

van Velzen, E. J., J. A. Westerhuis, J. P. van Duynhoven, F. A. van Dorsten, H. C. Hoefsloot, D. M. Jacobs, S. Smit, R. Draijer, C. I. Kroner and A. K. Smilde (2008). "Multilevel data analysis of a crossover designed human nutritional intervention study." *J Proteome Res* 7(10): 4483-4491.

Wan, A. K., W. K. Seow, D. M. Purdie, P. S. Bird, L. J. Walsh and D. I. Tudehope (2001). "Oral colonization of *Streptococcus mutans* in six-month-old pre-erupted infants." *J Dent Res* 80(12): 2060-2065.

Wan, A. K., W. K. Seow, D. M. Purdie, P. S. Bird, L. J. Walsh and D. I. Tudehope (2003). "A longitudinal study of *Streptococcus mutans* colonization in infants after tooth eruption." *J Dent Res* 82(7): 504-508.

Wei, J., Xie, G., Zhou, Z., Shi, P., Qiu, Y., Zheng, X., et al. (2011). Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia. *International Journal of Cancer*, 129(9), 2207–2217.

Wong DT. Salivary Diagnostic. New Delhi, India: Wiley-Blackwell; 2008:37–59.

World Health Organization. The World Oral Health Report. Geneva: WHO, 2003.

Xia, J., I. V. Sinelnikov, B. Han and D. S. Wishart (2015). "MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful." *Nucleic Acids Res* 43(W1): W251-257.

ANEXOS

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise dos componentes produzidos pelas bactérias e presentes na saliva de bebês antes e depois do nascimento dos dentes de leite.

Pesquisador: Tatiana Kelly da Silva Fidalgo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 02912418.8.0000.5289

Instituição Proponente: ASSOCIACAO SALGADO DE OLIVEIRA DE EDUCACAO E CULTURA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.050.625

Apresentação do Projeto:

Pesquisa observacional longitudinal, descritivo, prospectivo, tem como objetivo caracterizar o perfil metabólico de alguns microrganismos da flora bucal normal, assim como avaliar o perfil dos metabólitos salivares de bebês antes e após a erupção dentária. Para a análise do perfil salivar dos bebês, serão selecionados pacientes sistemicamente saudáveis entre 4 e 5 meses de idade cujos responsáveis autorizem a participação voluntária no estudo. Os responsáveis irão preencher uma ficha com dados pessoais e questionário sociodemográfico e, a cada avaliação, irão responder uma ficha de anamnese sobre informações de saúde e hábitos de higiene e dieta dos participantes. Os bebês serão submetidos a uma avaliação clínica inicial, realizada por um profissional treinado e calibrado, na qual todas as estruturas intraorais serão examinadas, sendo preenchida uma ficha de exame clínico padronizada. Os pacientes serão acompanhados após 4, 8, 14 e 20 meses da avaliação inicial. A cada avaliação, os responsáveis receberão instruções odontológicas e um kit de higiene bucal.

Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar o perfil de metabólitos de microrganismos bucais em alto e baixo desafio cariogênico, assim como avaliar o perfil metabólico salivar de bebês antes e após a erupção dentária.

Endereço: MARECHAL DEODORO, 263 Bl. B - 3º andar
Bairro: CENTRO **CEP:** 24.030-060
UF: RJ **Município:** NITEROI
Telefone: (21)2138-4941 **Fax:** (21)2138-4941 **E-mail:** cepuniverso@nt.universo.edu.br



Continuação do Parecer: 3.050.625

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

De acordo com a metodologia apresentada, pesquisa de considerada de risco mínimo conforme preconizado pela Resolução CNS nº. 466 de 12 de dezembro de 2012.

Benefícios:

Os benefícios desse estudo serão relacionados à elucidação do perfil normal da saliva de bebês saudáveis, assim como dos compostos produzidos por microrganismos bucais em condições de saúde, servindo de base de comparação para futuros estudos que investiguem as alterações salivares decorrentes de alterações bucais ou sistêmicas, que afetam inúmeros pacientes ao redor do mundo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa pertinente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados estão conforme a recomendação da Resolução CNS nº. 466 de 12 de dezembro de 2012

Recomendações:

Sem Recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto bem elaborado.

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	10/11/2018		Aceito

Endereço: MARECHAL DEODORO, 263 Bl. B - 3º andar
Bairro: CENTRO **CEP:** 24.030-060
UF: RJ **Município:** NITERÓI
Telefone: (21)2138-4941 **Fax:** (21)2138-4941 **E-mail:** cepuniverso@nt.universo.edu.br



Continuação do Parecer: 3.050.625

Básicas do Projeto	ETO_1138964.pdf	08:10:30		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_de_consentimento_livre_e_esclarecido.docx	10/11/2018 08:09:45	Tatiana Kelly da Silva Fidalgo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_de_pesquisa_completo.docx	10/11/2018 08:07:55	Tatiana Kelly da Silva Fidalgo	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	10/11/2018 08:02:45	Tatiana Kelly da Silva Fidalgo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

NITEROI, 01 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Regina Celi Lema
(Coordenador(a))

Endereço: MARECHAL DEODORO, 263 Bl. B - 3º andar
Bairro: CENTRO **CEP:** 24.030-060
UF: RJ **Município:** NITEROI
Telefone: (21)2138-4941 **Fax:** (21)2138-4941 **E-mail:** cepuniverso@nt.universo.edu.br

APENDICES

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOPEDIATRIA E ORTODONTIA
DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do público do projeto de pesquisa: **“Análise dos componentes gerados pelas bactérias e presentes na saliva de bebês antes e depois do nascimento dos dentes de leite”**

Seu filho (a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa sobre as substâncias presentes na saliva dos bebês antes e depois do nascimento dos dentes de leite. Os Pesquisadores Aline dos Santos Letieri, Tatiana Kelly da Silva Fidalgo, Ana Paula Canedo Valente e Ivete Pomarico Ribeiro de Souza pretendem realizar um estudo com as seguintes características:

Objetivo do estudo: avaliar alguns dos componentes presentes na saliva dos bebês antes e depois do nascimento dos dentes de leite.

O motivo que nos leva a estudar esse assunto é que os dados sobre esses componentes ainda são pouco conhecidos. Esse conhecimento pode auxiliar na identificação precoce de doenças na boca e em todo o corpo.

Nessa pesquisa, será retirado um pouco de saliva da boca do seu filho (a) com um aparelho semelhante a um canudo de plástico e será feito exame da boca dele (a). Seu filho (a) não sentirá nenhum desconforto durante esses procedimentos. Além disso, você também deverá responder a perguntas sobre a alimentação, os hábitos de higiene bucal e informações de saúde sobre ele (a).

Riscos: Os riscos relacionados a esta pesquisa são os mesmos relacionados a qualquer consulta odontológica de avaliação clínica. Para

diminuir os riscos, tanto para o dentista quanto para o paciente, equipamentos de proteção pessoal serão utilizados.

Garantia de acesso aos pesquisadores: Em qualquer fase do estudo você terá pleno acesso à pesquisadora responsável, Ivete Pomarico Ribeiro de Souza, pelos telefones 99994-3131, 2562-2101 ou 2562-2098, ou na Faculdade de Odontologia da UFRJ – Departamento de Odontopediatria e Ortodontia, localizada na Av. Brigadeiro Trompowsky, s/n, Cidade Universitária, Rio de Janeiro.

Garantia de liberdade: Sua participação neste estudo é absolutamente livre e voluntária. Logo, 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 ou prejuízo a você ou ao seu filho (a). 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 às avaliações agendadas e que responda aos questionários.

Direito de confidencialidade e acessibilidade: os dados resultantes da presente pesquisa serão utilizados para elaborar artigos científicos. Porém, todas as informações obtidas serão confidenciais e asseguramos o absoluto sigilo de sua participação. Os dados não serão divulgados de forma que identifique algum participante em específico e ninguém, com exceção dos próprios pesquisadores, poderá ter acesso aos resultados da pesquisa. Cada responsável somente poderá ter acesso aos resultados dos seus próprios filhos (as).

Despesas e compensações: você não terá, em momento algum, despesas financeiras pessoais geradas pela pesquisa. As despesas que porventura vierem a acontecer, 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 asseguram o ressarcimento e indenização no caso de o voluntário/responsável 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 todas as 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

Nome do responsável

Assinatura do(a) responsável

Assinatura do(a) pesquisador(a) responsável

Apêndice B – Ficha de Anamnese

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOPEDIATRIA E ORTODONTIA
DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

FICHA DE ANAMNESE

Paciente No: _____ Data: ____/____/____

Nome: _____

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

Nome da mãe: _____

Nome do pai: _____

Endereço: _____

Cep: _____ Cidade: _____ Estado: _____

Telefones _____ / _____ / _____

Nome do responsável: _____

Grau de parentesco/relação com a criança: _____

1 – Gestação: 1.1 A gestação foi normal ou com intercorrências?

() Normal () Intercorrências

Em caso de intercorrência, qual?

1.2 Utilizou medicamentos? () Sim () Não Qual?

1.3 Parto: () Normal () Cesariana

1.4 Intercorrências? () Sim () Não Qual?

1.5 Prematuro? () Sim () Não Quantas semanas?

1.6 Incubadora? () Sim () Não Quanto tempo?

1.7 Foi entubado? () Sim () Não Quanto tempo?

2- O paciente está em tratamento médico no momento? () Sim () Não

Motivo: _____

3- O paciente já foi hospitalizado? () Sim () Não Razão:

4- Já recebeu transfusão sanguínea? () Sim () Não Razão:

5- Já recebeu algum dos seguintes tratamentos?

() Cardíaco

() Endócrino

() Psicológico

- Sanguíneo Renal Gastrointestinal
 Hepático Neurológico Dermatológico
 Ortopédico Oftalmológico Otorrinolaringológico
 Respiratório

6- Já apresentou algum desses distúrbios ou afecções?

- Sarampo Poliomielite Tétano Desmaio Caxumba Febre Reumática Diabetes Convulsões Catapora Rubéola Escarlatina
 Anemia Difteria Herpes labial Pneumonia Hepatite, tipo? _____
 Sapinho

7- Histórico de alergia:

Medicamentos:

- Não Sulfa Penicilina Iodo Dipirona Cefalosporina

Outros: _____

Outros:

- Não Alimentar Respiratória

Especificar: _____

8- O paciente tem alguma alteração sistêmica?

- Sim Não Caso sim, qual?

9 – Usa medicamentos continuamente?

Sim Não Caso sim, qual?

10 – Está fazendo uso de alguma medicação no momento?

Sim Não Caso sim, qual?

11 – Fez aleitamento materno?

Sim Não Caso sim, até quando?

12 – Faz aleitamento no peito materno atualmente? Sim Não

13 – O paciente fez amamentação artificial (mamadeira)?

Sim Não Caso sim, até quantos anos?

14– O paciente usa mamadeira atualmente?

Sim Não Conteúdo da mamadeira:

15 – A criança escova os dentes ou faz higiene da boca? Sim Não

Especificar como faz a higiene:

16 – Se sim, quem escova os dentes do paciente?

A criança O responsável

17 – Qual principal tipo de alimentação do paciente?

Líquida Pastosa Sólida

18 – Qual foi a última coisa que o paciente comeu e/ou bebeu?

19 – Qual horário que o paciente se alimentou pela última vez? _____

20 – O paciente escovou os dentes ou limpou a boca após essa última refeição? Sim Não

Se sim, qual horário fez essa última escovação/limpeza: _____

Data: ____/____/20__

Responsável do paciente:

(assinatura do responsável)

Apêndice C – Ficha de exame de cárie dentária

Ficha de exame de cárie dentária

Paciente Nº: _____

Data: ____/____/____

Nome: _____

55 54 53 52 51 61 62 63 64 65

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

85 84 83 82 81 71 72 73 74 75

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

c	e	o	ceos

▪ **CONDIÇÃO DENTAL DECÍDUO (Legenda):**

A = Hígido;

B = Cariado;

C = Restaurado com cárie;

D = Restaurado sem cárie;

E = Perdido por cárie;

F = Perdido por outras razões;

G = Selante;

H = Não erupcionado

T = Trauma (fratura)