

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA ODONTOLÓGICA
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

ANA CATARINA DE MIRANDA MOTA

ANÁLISE DO PERFIL DE PROTEÍNAS SALIVARES, EXPERIÊNCIA DE
CÁRIE E NÍVEIS DE *STREPTOCOCCUS mutans* EM POPULAÇÃO DE
CRIANÇAS DESNUTRIDAS

Fortaleza
2008

ANA CATARINA DE MIRANDA MOTA

ANÁLISE DO PERFIL DE PROTEÍNAS SALIVARES, EXPERIÊNCIA DE
CÁRIE E NÍVEIS DE *STREPTOCOCCUS mutans* EM POPULAÇÃO DE
CRIANÇAS DESNUTRIDAS

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação
Em Odontologia, da Universidade
Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do título de
mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cristiane Sá Roriz Fonteles

Fortaleza
2008

M871a Mota, Ana Catarina de Miranda

Análise do perfil de proteínas salivares, experiência de cárie e níveis de *Streptococcus mutans* em população de crianças desnutridas/ Ana Catarina de Miranda Mota. 2008.

143 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Fortaleza, 2008.

1. Cárie Dentária. 2. Desnutrição. 3. Proteínas Salivares. I. Fonteles, Cristiane Sá Roriz (orient.). II. Título.

CDD 617.601

ANA CATARINA DE MIRANDA MOTA

ANÁLISE DO PERFIL DE PROTEÍNAS SALIVARES, EXPERIÊNCIA DE CÁRIE
E NÍVEIS DE ESTREPTOCOCOS MUTANS EM POPULAÇÃO DE CRIANÇAS
DESNUTRIDAS

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Cristiane Sá Roriz Fonteles (orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof.^a Dr.^a Maria Eneide Leitão de Almeida
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof.^a Dr.^a Cláudia Ferreira Santos
Universidade Estadual do Ceará - UECE

À minha mãe Rosanira (*in memoriam*)
e ao meu pai Vicente, por terem me dado
sempre as condições necessárias para trilhar o
meu caminho e saborear minhas vitórias.

A Maria Fernanda, luz do meu viver,
razão da busca diária do meu crescimento.

AGRADECIMENTOS

Às grandes amigas Eneide e Aglaê, pelo incentivo para realização deste Mestrado; por compartilharem comigo momentos de angústia e conquistas, profissionais e pessoais; e por não medirem esforços em me apoiar nos momentos difíceis.

À Erika, amiga e sócia, por facilitar as mudanças necessárias no consultório, de modo a estar mais presente no Mestrado.

À Valéria, minha atendente, pelo fato de resolver todos os problemas do consultório, facilitando a minha ausência e otimizando meu tempo de trabalho.

À Consuelo, por cuidar tão bem da minha filha, minimizando os efeitos da minha ausência.

Aos alunos de graduação que colaboraram de alguma forma com esta pesquisa, em especial a Milene, por haver repassado seus conhecimentos no início dessa pesquisa; à Tatiana e à Karla, pela presteza e ajuda indispensáveis em todas as fases da pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal - Olavo, Teresinha e Everardo - pela ajuda durante a etapa microbiológica da pesquisa.

À funcionária do Laboratório de Farmacologia Metabólica e Fisiologia Celular, Sílvia, por toda atenção e ajuda durante a fase bioquímica da pesquisa.

À Rosa, pela liofilização das amostras.

À Eloneide, pela seleção dos voluntários no início da pesquisa.

À Marta, pelo auxílio durante as aulas de Clínica, e por estar sempre presente quando precisava.

Aos laboratórios de Anaeróbios (UFC), de Farmacologia Metabólica e Fisiologia Celular (UFC) e de Farmacologia Cardiovascular e Celular (UECE), onde a pesquisa foi realizada.

Ao Instituto de Prevenção à Desnutrição e à Excepcionalidade (IPREDE), onde os voluntários foram selecionados.

A Prof.^a Dr.^a Cristiane Sá Roriz Fonteles, minha orientadora, pelos seus ensinamentos e por suas palavras de apoio e amizade, em todos os momentos deste Mestrado.

À Prof.^a Dr.^a Cibele Barreto Mano de Carvalho (UFC), pela colaboração e orientação da fase microbiológica da pesquisa.

À Prof.^a Dr.^a Cláudia Ferreira Santos (UECE), pela colaboração e orientação da fase bioquímica da pesquisa.

Ao Prof. Dr. André Jalles Monteiro (UFC), pela execução da análise estatística dos dados.

Ao Prof. Dr. José Luciano Moreira, por ter cedido tão gentilmente seus livros de Microbiologia e por seu acolhimento sempre que precisava.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFC, Lúcia e Germano, pela ajuda e atenção.

À coordenação e ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, em razão dos esforços pela implementação e manutenção do Mestrado.

À bibliotecária Rosane Costa, da Biblioteca da Ciências da Saúde da UFC, pela correção das referências bibliográficas.

Ao Mauro Gurgel, por toda a sua ajuda na parte gráfica.

À Dijane, que dividiu comigo as inúmeras dificuldades para realização da pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos aos voluntários desta pesquisa e aos seus pais, por permitirem suas participações.

À FUNCAP, pelo apoio financeiro.

A todos os que, direta e indiretamente, contribuíram para essa pesquisa ser concluída.

RESUMO

O presente estudo compara experiência (ceo-s) e severidade da cárie de primeira infância (S-CPI), níveis salivares de estreptococos do grupo *mutans* (EGM), concentração de proteína total salivar (CPT) e perfil protéico salivar (PPS), entre crianças nutridas e desnutridas. Cento e vinte crianças desnutridas, com 12 e 70 meses de idade, com e sem experiência de cárie, foram divididas entre os graus de desnutrição de acordo com a OMS: leve (GI, n=31), moderado (GII, n=59) e grave (GIII, n=31). Quarenta e sete crianças nutridas (GN) participaram do experimento como controle. Saliva total não estimulada foi coletada de todos os participantes e centrifugada; o sobrenadante foi retido, liofilizado, armazenado a -20° C e analisado para CPT pelo método de Bradford e eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS pelo método de Laemmli. Saliva total estimulada foi coletada e utilizada para detecção de EGM no meio MSB (ufc/mL). Exame dental foi realizado e calculado o índice ceo-s e S-CPI. As variáveis idade (p= 0,0000), logaritmo da contagem de EGM (p=0,0321) e estado nutricional (p=0,0316) apresentaram contribuição positiva para o desenvolvimento da cárie dentária. As variáveis sexo (p=0,7094) e CPT (p=0,2720), no entanto, não contribuíram de forma significativa para a experiência de cárie. Quando comparadas a GN, crianças GI (p=0,0042) e GIII (p=0,0372) apresentaram maior risco à cárie. Não houve alteração do PPS das crianças dos grupos GN, GI e GII. O grupo GIII não expressou uma banda protéica (123,56±4,35 kDa) na presença da doença cárie. CPT não se associou à experiência de cárie (p=0,5651), severidade da doença (p=0,6015) ou contaminação por EGM (p=0,2162). Os resultados deste estudo sugerem que o estado nutricional aumenta o risco à cárie em crianças desnutridas leve e grave, havendo um perfil protéico diferenciado em crianças gravemente desnutridas com experiência de cárie.

Palavras-chave: Cárie dentária, desnutrição e proteínas salivares.

ABSTRACT

The aim of the present study was to compare caries experience (dmfs), severity of early childhood caries (S-ECC), salivary mutans streptococci (MS) levels, total protein concentration (TPC) and salivary protein profile (SPP) between nourished and malnourished children. One hundred and twenty 12-70 month-old malnourished children, with and without ECC were separated into being mildly (GI, n=31), moderately (GII, n=59) or severely (GIII, n=31) malnourished, according to WHO standards. Forty-seven nourished children (GN) were used as controls. Unstimulated whole saliva was collected from all participants, subsequently centrifuged. Supernatants were lyophilized and stored at -20o C for posterior TPC analysis by the Bradford method. Salivary protein profile was obtained by electrophoresis in SDS-poliacrilamide gel through the Laemmli method. Stimulated whole saliva was collected and used for MS detection in MSB agar medium. MS concentration in saliva was reported in cfu/mL. Dental examination was performed and dmfs scores and S-ECC were calculated. Age (p=0,0000), MS counts (p=0,0321) and nutritional status (p=0,0316) demonstrated positive contribution for the development of dental caries. However, gender (p=0,7094) and TPC (0,2720) did not significantly contribute with caries experience. When compared to GN, children in GI (p=0,0042) and GIII (p=0,0372) presented higher risk of experiencing dental caries. In addition, no differences in SPP were observed between these groups. GIII children did not express one protein band (123,56±4,35 kDa) in the presence of dental caries. TPC was not associated with caries experience (p=0,5651), severity of ECC (p=0,6015) or MS counts (p=0,2162). Our results suggest that nutritional status increases caries risk in mildly and severely malnourished children, and salivary protein profile differs among severely malnourished children with dental caries.

Key-words: Dental caries, malnutrition and salivary protein

LISTRA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAPD – American Academy of Pediatric Dentist
B – componente cariado do índice CPO
BSA – albumina sérica bovina
C – canino
ceo-d – número de dentes cariados, extraídos e obturados na dentição decídua
ceo-s - número de superfícies dentárias cariadas, extraídas e obturadas na dentição decídua
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
CF – cárie de fissura
CM – cárie de mamadeira
CPI – cárie de primeira infância
CPO-D – número de dentes cariados, perdidos e obturados na dentição permanente
CPO-S – número de superfícies dentárias cariadas, perdidas e obturadas na dentição permanente
CPT – concentração de proteínas totais salivares
D - componente obturado do índice CPO
DEP – desnutrição energético-protéica
E - componente extraído do índice CPO
FFOE – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem
EGM – estreptococos do grupo mutans
F – sexo feminino
GI – grau de desnutrição I
GII – grau de desnutrição II
GIII – grau de desnutrição III
GM1 – glicoproteína mucina 1
GM2 - glicoproteína mucina 2
GN – grupo de crianças saudáveis
HCl – ácido clorídrico
IC – incisivo central
Ig A – imunoglobulina A
IgA anti-EGM - – imunoglobulina A anti-estreptococos do grupo mutans
IgG – imunoglobulina G
IgM – imunoglobulina M
IL – incisivo lateral
INAN – Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição
IPREDE – Instituto de Prevenção à Desnutrição e a Excepcionalidade
kDa – kilo Dalton
M – sexo masculino
M – molar

mM – milimolar
mA - miliampere
MGRS – Multicentre Growth Reference Study
MSA – ágar mitis salivarius
MSB - ágar mitis salivarius bacitracina
 μgP – micrograma de proteína
 μL – microlitro
 μm – micrômetro
nm – nanômetro
OMS – Organização Mundial de Saúde
1° M – primeiro molar
 PO_4 – fosfato
PRP – proteínas ricas em prolina
rpm – rotações por minuto
2° M – segundo molar
SC – sem cárie
S-CPI – severidade da cárie de primeira infância
SDS – dodecil sulfato de sódio
STH – saliva total humana
TCA – ácido tricloroacético
UECE – Universidade Estadual do Ceará
UFC – Universidade Federal do Ceará
ufc/mL – unidade formadora de colônia por microlitro
WHO – World Health Organization
 X^2 – Teste do Qui-quadrado

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição das crianças por idade quanto ao grau de desnutrição e ao sexo em relação à presença ou ausência de cárie dentária (cavitada ou não-cavitada).

Tabela 2. Distribuição dos sexos entre as crianças saudáveis (nutridas) e para cada grau de desnutrição.

Tabela 3. Comparação das variáveis: idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s; entre os sexos, nos saudáveis e para cada grau de desnutrição.

Tabela 4. Comparação das idades, nos diferentes estados nutricionais, com e sem experiência de cárie.

Tabela 5. Comparação das idades, nas crianças com experiência de cárie, entre os diferentes estados nutricionais.

Tabela 6- Distribuição das crianças quanto à localização das lesões de cárie (cavitada ou não cavitada) para cada grau de desnutrição.

Tabela 7- Distribuição das crianças nutridas por idade e sexo em relação à presença ou não de cárie (cavitada ou não-cavitada).

Tabela 8- Distribuição das crianças nutridas quanto à localização das lesões de cárie (cavitada ou não-cavitada) para cada grau de desnutrição.

Tabela 9 – Distribuição das crianças com cárie (ceo-d, ceo-s e S-CPI) por grau de desnutrição e sexo, segundo AAPD.

Tabela 10 – Distribuição dos dentes cariados em relação à idade (meses) e quanto ao grau de desnutrição.

Tabela 11 – Distribuição das lesões de cárie nas crianças desnutridas por superfície dentária em relação à idade (meses).

Tabela 12. Correlação de monotonicidade entre as variáveis: idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, com as crianças desnutridas.

Tabela 13. Comparação das variáveis: idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, nos diferentes graus de desnutrição, excluindo os pacientes saudáveis.

Tabela 14. Comparação das variáveis: idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, nos diferentes graus de desnutrição, com a inclusão dos saudáveis.

Tabela 15 - Distribuição do índice ceo-d e ceo-s (OMS) por grau de desnutrição e por idade.

Tabela 16 – Distribuição das crianças com cárie (severa ou não) quanto ao grau de desnutrição e sexo por idade.

Tabela 17. Comparação entre sexo e severidade da cárie dentária.

Tabela 18. Comparação entre graus de desnutrição e severidade da cárie dentária.

Tabela 19. Comparação das variáveis: idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, entre a presença e ausência de cárie, em que na presença estão incluídos os graus severo e não-severo.

Tabela 20. Análises de variáveis em um Modelo Binário Logístico.

Tabela 21 – Distribuição da contaminação por EGM em relação ao grau de desnutrição e ao sexo.

Tabela 22 - Distribuição da contaminação por EGM em relação ao ceo-s.

Tabela 23 - Distribuição dos níveis de contaminação de EGM em relação à idade.

Tabela 24. Comparação das variáveis: idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, entre os graus severo e não-severo.

Tabela 25. Comparação dos logaritmos da contagem de EGM, nos diferentes estados nutricionais, com e sem experiência de cárie.

Tabela 26. Comparação das variáveis: idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, entre os graus de desnutrição leve e moderado.

Tabela 27. Comparação das variáveis: idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, entre os saudáveis e os graus de desnutrição leve e moderado (juntos).

Tabela 28. Comparação das variáveis: idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, entre o grau de desnutrição grave e os graus de desnutrição leve e moderado (juntos).

Tabela 29. Comparação das variáveis: idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, entre os saudáveis e o grau de desnutrição grave.

Tabela 30. Comparação das variáveis: idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, nos diferentes graus de severidade.

Tabela 31. Média \pm (desvio padrão) das massas moleculares das bandas protéicas em relação ao sexo, identificadas entre crianças saudáveis (GN), desnutridas em graus leve (GI), moderado (GII) e grave (GIII), associadas à frequência das bandas em cada grupo. Massas moleculares expressas em kDa. Frequência das bandas expressas em termos numéricos.

Tabela 32. Média \pm (desvio padrão) das massas moleculares das bandas protéicas em relação à experiência de cárie ou não, identificadas entre crianças saudáveis (GN), desnutridas em graus leve (GI), moderado (GII) e grave (GIII), associadas à frequência das bandas em cada grupo. Massas moleculares expressas em kDa. Frequência das bandas expressas em termos numéricos.

Tabela 33. Média \pm (desvio padrão) das massas moleculares das bandas protéicas em relação à contaminação por EGM ou não, identificadas entre crianças saudáveis (GN), desnutridas em graus leve (GI), moderado (GII) e grave (GIII), associadas à frequência das bandas em cada grupo. Massas moleculares expressas em kDa. Frequência das bandas expressas em termos numéricos.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição das proteínas salivares de crianças saudáveis e de crianças com diferentes graus de desnutrição (leve, moderada e grave), sem cárie (C-) e com cárie (C+) nas faixas de 0-20 kDa, 20-40 kDa, 40-80 kDa e 80-160 kDa.

Gráfico 2. Distribuição das proteínas salivares de crianças saudáveis e de crianças com diferentes graus de desnutrição (leve, moderada e grave), com EGM (+) e sem EGM (-).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gel de Poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) mostrando perfis de proteínas de saliva não estimulada de um grupo de crianças saudáveis sem cárie (colunas 3, 7 e 8) e com cárie (colunas 2, 4, 5 e 6). A 1ª coluna é o marcador do peso molecular.

Figura 2. Gel de Poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) mostrando perfis de proteínas de saliva não estimulada de um grupo de crianças GI sem cárie (colunas 5 e 7) e com cárie (colunas 2, 3, 4 e 6). Nas colunas 1 e 8: marcador do peso molecular.

Figura 3. Gel de Poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) mostrando perfis de proteínas de saliva não estimulada de um grupo de crianças GII sem cárie (colunas 2, 4 e 5) e com cárie (colunas 3, 6 e 7). Nas colunas 1 e 8: marcador do peso molecular.

Figura 4. Gel de Poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) mostrando perfis de proteínas de saliva não estimulada de um grupo de crianças GIII sem cárie (colunas 3, 4 e 6) e com cárie (colunas 2, 5 e 7). Nas colunas 1 e 8: marcador do peso molecular.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Desnutrição.....	19
2.1.1 Desnutrição e Cárie Dental	21
2.1.2 Desnutrição e Hipofunção Salivar	23
2.2 Saliva	24
2.2.1 Propriedades e Funções da Saliva.....	26
2.2.1.1 Ação Neutralizadora da Saliva e Capacidade-Tampão	26
2.2.1.2 Saturação ou Homeostase	27
2.2.1.3 Função Protetora	27
2.2.1.4 Formação da Película Adquirida	27
2.2.1.5 Formação da Placa	28
2.3 Composição Salivar	28
2.3.1 Componentes Inorgânicos.....	28
2.3.2 Componentes Orgânicos	29
2.3.2.1 Proteínas Salivares	29
2.3.3 Fatores que Influenciam a Composição Salivar.....	36
2.3.4 Sistema Salivar na Infância.....	38
2.4 Cárie e EGM.....	39
2.4.1 Relação entre Cárie e EGM em Crianças Jovens.....	41
2.4.2 Cárie Precoce da Infância	42
2.5 Cárie e Hipoplasia de Esmalte	48
3. OBJETIVOS	49
3.1 Objetivo Geral.....	49
3.2 Objetivos Específicos	49
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1 Delineamento Experimental.....	50
4.2 População.....	50
4.3 Seleção dos Voluntários	50
4.3.1 Critérios de Inclusão	50
4.3.2 Critérios de Exclusão	51
4.4 Entrada do Voluntário no Estudo.....	51
4.4.1 Anamnese.....	51
4.4.2 Exame Dentário	51
4.4.3 Coleta de Saliva	52
4.5 Transporte e Armazenagem dos Espécimes.....	52
4.6 Análise Microbiológica	53

4.6.1 Diluição da Saliva Estimulada, Semeadura e Incubação	54
4.6.2 Contagem das Colônias.....	54
4.6.3 Aplicação dos Testes Bioquímicos.....	54
4.7 Análise das Proteínas Salivares	54
4.7.1 Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford	54
4.7.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e β -mercaptoetanol	55
4.8 Análise Estatística	56
5 RESULTADOS	57
5.1 Grau de Desnutrição	57
5.2 Sexo.....	57
5.3 Idade.....	57
5.4 Experiência de Cárie.....	58
5.5 Contaminação por EGM	60
5.6 Hipoplasia de Esmalte	61
5.7 Concentração de Proteínas Totais Salivares.....	61
5.8 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e β-mercaptoetanol.....	61
6 DISCUSSÃO.....	86
7 CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS.....	97
APÊNDICES	XX
ANEXOS.....	111

1 INTRODUÇÃO

Universalmente, cárie da primeira infância (CPI) e desnutrição energético-protéica (DEP) são significantes problemas de saúde pública em diferentes países. A desnutrição por falta de alimento representa, hoje, o mais grave problema de ordem médico-social do mundo. O alimento fornece a matéria para manter a integridade dos tecidos, elaborar substâncias necessárias à vida e atender aos gastos energéticos. Na criança, além de preencher essas finalidades, proporciona crescimento e desenvolvimento (PERNETTA, 1979). Assim, a criança sofre em muito maior grau os efeitos deletérios da falta de alimento. Na infância, a desnutrição grave conduz com maior rapidez à morte, é mais difícil de tratar e prejudica de modo considerável o crescimento e o desenvolvimento, deixando nos sobreviventes seqüelas tanto mais acentuadas quanto mais tenra for a idade. Quando se faz sentir nos primeiros anos de vida, prejudica a altura definitiva, inibe o pleno desenvolvimento da inteligência e provoca uma instabilidade emocional, que se arrasta pela adolescência e idade adulta (PERNETTA, 1979).

Infelizmente a alta prevalência de DEP observada durante a primeira infância, especialmente entre as idades de 2 e 5 anos (WHO, 2000), coincide com o tempo em que a presença da cárie dental pode ser excepcionalmente agressiva, com potencial para aumentar as dificuldades de alimentação, aumentando o risco a infecções (SCHWARTZ, 1994), dificultando o ganho de peso (AYHAN *et al.*, 1996) e bem-estar da criança (LOW *et al.*, 1999). Desnutrição afeta diferentes populações no mundo, com efeitos adversos na saúde, mortalidade e produtividade, sendo um fator em potencial na metade dos óbitos de crianças abaixo de 5 anos de idade (SEAL; KERAC, 2007). Assim, 26,7% das crianças do mundo nesta faixa etária, são ainda desnutridas quando considerado o peso por idade. Quando considerada altura por idade, no entanto, mais de 180 milhões de crianças abaixo de 5 anos de idade são desnutridas (WHO, 2000). Existe estreita ligação entre as deficiências nutricionais mais freqüentes e o grau de desenvolvimento social e econômico de cada região. Para países de economia dependente como o Brasil, a desnutrição assume importância fundamental, tanto por sua prevalência quanto por seu significado. No Brasil, estima-se que cerca de 22 milhões de brasileiros possam ser classificados como indigentes e 53 milhões como pobres (DUNCAN *et al.*, 2004).

CPI é uma doença infecciosa e transmissível na dentição decídua, com uma etiologia complexa e multifatorial, envolvendo microorganismos cariogênicos, carboidratos fermentáveis e superfícies dentárias suscetíveis (RAMOS-GOMEZ *et al.*, 2002). Em um ambiente favorável, estas variáveis iniciarão o processo cariioso. O consumo freqüente de carboidratos fermentáveis, especialmente alimentos infantis ofertados em mamadeiras, pode aumentar significativamente a severidade da CPI (HALLETT; O'ROURKE, 2006). Portanto, o padrão de cárie pode ser afetado pela idade, morfologia dental, seqüência de erupção, fatores dietéticos e ambientais

(ÖLMEZ *et al.*, 2003). Segundo a Academia Americana de Odontopediatria (AAPD), uma criança deve ser diagnosticada como tendo CPI se pelo menos uma superfície dental estiver comprometida por cárie (cavitada ou não), perdida ou restaurada em qualquer dente decíduo, em crianças com idade igual ou abaixo de 71 meses. Apesar da experiência prévia de cárie permanecer como o melhor preditor de futura atividade de cárie (BOWDEN, 1997), medição de estreptococos do grupo *mutans* (EGM) salivares ajudarão a identificar crianças que apresentam alto risco em desenvolver CPI (THIBODEAU; O'SULLIVAN, 1999). Embora a etiologia da CPI seja semelhante a outros tipos de cáries, a biologia pode diferir em alguns aspectos: a flora bacteriana e os fatores de defesa na criança pequena estão sendo estabelecidos e as superfícies dentárias são recém-erupcionadas e imaturas (SEOW, 1998).

O caráter infecto-contagioso da CPI aponta em direção a uma ativa participação de componentes antimicrobianos salivares na patogênese da doença (FARIAS; BEZERRA, 2003). Hipofunção da glândula salivar pode ser definida pela diminuição do índice de fluxo salivar, diminuição da capacidade-tampão e redução dos constituintes salivares, particularmente as proteínas. Vale ressaltar que deficiência na quantidade e qualidade da saliva secretada foi previamente demonstrada em populações de crianças desnutridas, comprometendo as defesas e aumentando o risco à cárie dental (PSOTER *et al.*, 2005). Há um pequeno número de pesquisas investigando hipofunção salivar e desnutrição em humanos, estas só investigam parte da função salivar e os resultados são muitas vezes divergentes: diminuição do índice do fluxo salivar estimulado (JOHANSSON *et al.*, 1992; JOHANSSON *et al.*, 1994); diminuição da capacidade-tampão (JOHANSSON *et al.*, 1992; JOHANSSON *et al.*, 1994); redução de cálcio e cloreto, mas mesmos níveis de sódio, potássio e fosfato (JOHANSSON *et al.*, 1994); diminuição de IgA (MCMURRAY *et al.*, 1977; REDDY *et al.*, 1976; AZZOPARDI; WATSON, 1986) ou não (JOHANSSON *et al.*, 1994); diminuição de proteínas salivares (AGARWAL *et al.*, 1984), aumento de proteínas salivares (EL-SHOBAKI *et al.*, 1978; IBRAHIM *et al.*, 1978) ou nenhuma alteração na concentração de proteínas totais (JOHANSSON *et al.*, 1994).

Deficiência nutricional tem importante influência no desenvolvimento da cárie dental. É previamente demonstrado o fato de que crianças com DEP têm atraso de erupção e esfoliação dental, alta prevalência de hipoplasia de esmalte e hipofunção das glândulas salivares (PSOTER *et al.*, 2005). A provável influência da DEP sobre os fatores de risco predisponentes à cárie, faz entender que crianças desnutridas têm alta experiência de cárie nas dentições decídua (ALVAREZ *et al.* 1990) e permanente (ALVAREZ, 1995). Assim, DEP tem grande relevância nos fatores do hospedeiro associados à cárie, tais como defeitos nas superfícies dentais e no sistema salivar, contudo, se o estado nutricional da criança sozinho muda o risco de desenvolver a doença cárie é um achado que permanece por ser estabelecido.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Desnutrição

A desnutrição energético-protéica (DEP) apresenta como condicionante biológico um consumo energético e protéico inadequado, agravado por freqüentes surtos de gastroenterites e outros processos infecto-contagiosos que, além de aumentar os requerimentos do organismo, dificultam o aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos (D'AVILA, 1999; LAJOLO; TIRAPEGUI, 2003; DEVINCENZI *et al.*, 2004); essas condições estão intimamente relacionadas com o padrão de vida da população, que inclui o acesso à alimentação, moradia e assistência à saúde (DEVINCENZI *et al.*, 2004).

A DEP pode, quanto à origem, ser primária (dietética) ou secundária (condicionada) (BATISTA F^o, 2003; LAJOLO; TIRAPEGUI, 2003). O consumo inadequado de nutrientes é o fator determinante da desnutrição primária, enquanto a forma secundária é causada por outros fatores, diferentes da ingestão alimentar deficiente, como a interferência na ingestão, absorção e utilização dos nutrientes, em virtude de alguma afecção, ou de necessidades nutricionais aumentadas (LAJOLO; TIRAPEGUI, 2003). De acordo com a gravidade, a DEP pode ser classificada em leve, moderada ou grave; ou de I, II ou III graus; e, quanto à cronologia da manifestação, em progressiva e recente (D'AVILA, 1999).

As formas mais graves de DEP são o marasmo ou deficiência energética, o kwashiorkor, caracterizada por adequado suprimento calórico e deficiência protéica (D'AVILA, 1999; BATISTA F^o, 2003; LAJOLO; TIRAPEGUI, 2003), e o marasmo-kwashiorkor com deficiências de proteína e energia (LAJOLO; TIRAPEGUI, 2003). Marasmo é uma deficiência crônica de energia e proteínas, em estados avançados, caracterizado por perda da massa muscular e ausência de gordura subcutânea (D'AVILA, 1999; BATISTA F^o, 2003; LAJOLO; TIRAPEGUI, 2003). É encontrado em crianças de todas as idades, normalmente, durante o período de lactação em virtude de deficiência de alimentação, ou por uso de fórmulas muito diluídas (LAJOLO; TIRAPEGUI, 2003). O kwashiorkor é encontrado em crianças no último período de lactação, desmame e após desmame, geralmente em torno do 1^o ao 4^o ano de vida (LAJOLO; TIRAPEGUI, 2003), reflexo de deficiência crônica de proteínas, levando a um quadro de edema (BATISTA F^o, 2003; LAJOLO; TIRAPEGUI, 2003), cabelos avermelhados, descamação cutânea intensa (D'AVILA, 1999), hipoalbuminemia e fígado gorduroso (LAJOLO; TIRAPEGUI, 2003). Embora a gordura subcutânea seja geralmente preservada, a perda muscular é mascarada pelo edema (LAJOLO; TIRAPEGUI, 2003). Uma mistura da sintomatologia dos dois estados anteriores encontra-se presente no marasmo-kwashiorkor. A perda de gordura subcutânea é acentuada, especialmente, quando o edema é reduzido nas primeiras etapas do tratamento (LAJOLO; TIRAPEGUI, 2003).

O período entre a gestação e os 5 anos de idade é nutricionalmente o mais vulnerável segmento do ciclo da vida humana. O crescimento rápido, a perda da imunidade passiva e o

desenvolvimento do sistema imunológico contra infecções determinam necessidades dietéticas mais específicas e menor flexibilidade em relação a períodos mais tardios da vida (LAJOLO; TIRAPÉGUI, 2003). E é nesse grupo etário que se encontram as mais altas prevalências da DEP, mais frequentemente acometendo crianças entre os 2 e os 5 anos de idade (D'AVILA, 1999).

Em escala populacional, a prevalência da DEP pode ser avaliada mediante indicadores diretos (antropométricos, clínicos e bioquímicos) e indiretos (mortalidade infantil e pré-escolar, mortalidade por doenças infecciosas), além de variáveis sócio-econômicas, que podem ser consideradas preditivas do estado nutricional (BATISTA F^o, 2003). Os indicadores de uso mais comum, nos estudos de saúde coletiva e na própria rotina clínica, são as classificações antropométricas, em razão do comprometimento precoce dos processos básicos de crescimento e desenvolvimento na criança (D'AVILA, 1999; BATISTA F^o, 2003; DEVINCENZI *et al.*, 2004). Os parâmetros antropométricos ordinariamente utilizados para avaliar a condição nutricional de crianças são o peso e a altura, com os quais podem ser calculados os três índices mais frequentemente empregados: peso/idade, estatura/idade e peso/altura (D'AVILA, 1999; BATISTA F^o, 2003; Devincenzi *et al.*, 2004). As classificações antropométricas mais utilizadas são: Gómez (modificado por Bengoa), Waterlow (modificado por Batista) e a da Organização Mundial de Saúde (OMS) (DEVINCENZI *et al.*, 2004).

O padrão de crescimento infantil utilizado pela OMS (padrão OMS) é baseado em dados de um estudo internacional multicêntrico (Estudo Multicêntrico para Referência de Crescimento – MGRS) e reflete como crianças crescem sob ótimas condições. São dados sobre peso e altura por idade, relação peso/altura, por sexo masculino e feminino, desde o nascimento até os 71 meses de idade. Esse padrão pode ser usado para diagnóstico individual ou comparações internacionais (WHO, 2006). Com base no padrão OMS, o estado nutricional pode ser expresso usando escores Z ou percentual da mediana, onde o escore Z corresponde aos desvios-padrão do valor médio de referência para a mesma idade ou altura, sendo costumeiramente calculado usando o programa Epi Info 6.0 (Centers for Disease Control, Atlanta, USA). Os diferentes níveis de desnutrição com base nos valores de escore Z são conforme segue: leve (<-1 a >-2Z escores), moderado (<-2 a >-3Z escores) e grave (<-3Z escores), ou graus I, II e III, respectivamente (SEAL; KERAC, 2007).

Em estudos populacionais, as formas severas da desnutrição são pouco frequentes. Para a avaliação de grupos de crianças, muitas vezes são usados os termos *wasting* e *stunting*. Enquanto *wasting* descreve a deficiência de peso por idade (enfraquecimento, pouco consumo), *stunting* refere-se à deficiência de altura por idade (deficiência de crescimento de origem nutricional). Esses termos são utilizados pela OMS e substituem as expressões desnutrição aguda e desnutrição crônica. A mediana utilizada para *wasting* é 80% e para *stunting* é de 90% (BRUNSER *et al.*, 1985).

A DEP pode ser encontrada em todas as partes do mundo e em todas as idades, ocorrendo, principalmente, em crianças pobres dos países em desenvolvimento. No Brasil,

segundo o Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição (INAN), em uma pesquisa realizada em 1989, comprovou-se que a prevalência da desnutrição em crianças menores de 5 anos atingia 30,7%, sendo a desnutrição leve de 25,6% e o índice de desnutrição moderada ou grave de 5,1%. O cenário mais dramático apresentado é o da zona rural nordestina. As crianças brasileiras estão apresentando baixa estatura, sem, contudo, apresentar magreza excessiva, o que pode ser causado pela ingestão de uma alimentação desbalanceada. Os dados do INAN, para a população infantil de 0 a 5 anos, indicam que o déficit crônico de crescimento é cumulativo, aliado ou não ao baixo peso, sendo este o principal problema nutricional. Cerca de 2,5 milhões de crianças brasileiras nessa faixa etária têm altura abaixo do valor mínimo aceitável para as respectivas idades (LAJOLO; TIRAPEGUI, 2003).

2.1.1 Desnutrição e Cárie Dental

Desnutrição no início da infância tem importância na ocorrência de cárie na dentição decídua. A DEP em relação aos fatores do hospedeiro no que se relaciona à cárie, afeta principalmente o sistema salivar e a estrutura do esmalte (PSOTER *et al.*, 2005).

Sweeney *et al.* (1971) examinaram dois grupos de crianças na Guatemala. O primeiro grupo consistiu de 104 crianças, com idades de 2 a 7 anos, que estavam sendo tratadas de desnutrição grau III. O segundo grupo era formado por 150 crianças desnutridas grau I ou grau II. A prevalência de hipoplasia linear de esmalte no 1º grupo foi de 73,1% e no 2º grupo foi de 42,9%. A diferença entre os dois grupos foi estatisticamente significativa. Os autores observaram que as crianças que apresentaram hipoplasia de esmalte, tinham sofrido de desnutrição no período neonatal, mesmo com a ocorrência de evento único.

Um estudo em 528 crianças guatemaltecas da zona rural indicou que a prevalência de cárie na dentição decídua é duas vezes maior do que nas crianças estadunidenses brancas, mas não houve diferença na dentição permanente. Na dentição decídua, os meninos foram os mais afetados, mas na dentição permanente houve tendência de as meninas apresentarem mais cárie dental. Até os 4 anos de idade o segmento anterior foi o mais atacado pela cárie, tendo a hipoplasia do esmalte como um fator predisponente. A experiência de cárie nos molares decíduos também foi maior do que nas crianças estadunidenses (INFANTE; GILLESPIE, 1976).

Infante e Gillespie, em 1977, procurando estudar a relação entre hipoplasia do esmalte e experiência de cárie nos dentes decíduos, examinaram 388 crianças da zona rural da Guatemala, onde 113 apresentavam hipoplasia do esmalte linear na região anterior, 246 não apresentavam hipoplasia do esmalte linear e em 29 não foi possível o diagnóstico em virtude de grande extensão da cárie presente ou porque os dentes haviam esfoliado. Observaram que crianças que tinham os dentes anteriores afetados por hipoplasia do esmalte apresentavam mais cárie nos dentes posteriores do que as crianças que não exibiam hipoplasia do esmalte. O

percentual de crianças livres de cárie no grupo com hipoplasia foi pequeno, quando comparado com o grupo sem hipoplasia do esmalte. Os autores sugerem haver um sinergismo entre desnutrição e infecção, que pode formar a base da ocorrência de hipoplasia do esmalte linear nos dentes anteriores, podendo também predispor dentes posteriores com aparência clínica normal a um ataque excessivo de cárie igual ao observado nos dentes anteriores hipoplásicos.

Pesquisa transversal sobre cárie dental na dentição decídua e estado nutricional foi realizada em 285 crianças peruanas, com idades entre 3 e 9 anos e condições sócio-econômicas baixas. Quarenta e nove por cento das crianças apresentavam desnutrição crônica com baixa estatura para a idade, o que não só causou um atraso na erupção e esfoliação dental, como também deu aos dentes decíduos maior susceptibilidade ao ataque pela doença cárie em épocas posteriores (ALVAREZ *et al.*, 1988).

Alvarez *et al.*, em 1990, realizaram um estudo sobre cárie dental nos dentes decíduos em função do estado nutricional em 1481 crianças de 1 a 13 anos de idade no Peru. Quarenta e um por cento das crianças eram desnutridas crônicas, 3% apresentavam desnutrição aguda e 5% tinham comprometimento do peso e da altura em relação à idade. Um gráfico de CPOD X idade mostrou uma curva em sino que foi deslocada para direita por 2,5 anos para o grupo das crianças desnutridas, quando comparado com o das crianças normais. O deslocamento da distribuição de cárie pela idade para direita foi associado ao atraso de erupção e esfoliação dos dentes decíduos nas crianças desnutridas. O pico da atividade de cárie foi significativamente maior nas crianças desnutridas quando comparadas às normais. Os autores concluíram que a desnutrição atrasa o desenvolvimento dentário, afeta a distribuição de cárie por idade e resulta no aumento da experiência de cárie nos dentes decíduos.

Em 1992, Johansson *et al.* avaliaram 68 crianças indianas divididas em dois grupos: (1) nutridas ou desnutridas leve e (2) desnutridas moderada ou grave – e compararam esses dois grupos com um grupo de crianças suecas. O índice de secreção salivar estimulado diminuiu em proporção ao grau de desnutrição, mas o índice de secreção salivar não estimulado não foi afetado. A capacidade-tampão diminuiu com o índice de secreção salivar. Assim, crianças com desnutrição grave tinham redução significativa na capacidade-tampão em relação às crianças nutridas ou desnutridas leve. A prevalência de cárie dental foi significativamente maior nos dentes decíduos e permanentes das crianças desnutridas. Todas as crianças indianas estavam contaminadas por EGM, sendo que a maior parte delas estava altamente infectada: 65% do grupo 1 e 74% do grupo 2 tinham mais do que 10^6 unidades formadoras de colônias (ufc)/mL de saliva. Observaram que DEP durante o período de crescimento e desenvolvimento causa perturbações permanentes das funções das glândulas salivares e estrutura dental. Concluíram que a desnutrição crônica potencializa a cariogenicidade da sacarose e outros carboidratos fermentáveis.

No ano seguinte, Alvarez *et al.* (1993) conduziram um estudo longitudinal em 209 crianças peruanas, com idade entre 6 e 11 meses, para avaliar o efeito de um só período de

desnutrição na cárie dental dos dentes decíduos. Apenas um episódio de desnutrição foi suficiente para causar atraso na erupção de todos os dentes decíduos e aumentou a susceptibilidade à cárie 3 ou 4 anos depois do episódio de desnutrição para as crianças que tinham baixo peso para a altura e baixa altura para a idade. Em 1995, Alvarez realizou o segundo estudo transversal, procurando relacionar estado nutricional e cárie dental. O autor pôde observar atraso em relação à erupção dos dentes decíduos, mas, em relação aos dentes permanentes, houve aceleração na erupção dental. No que se refere à esfoliação dental, baixo peso por altura foi mais significativo que baixa altura por idade. Os resultados da pesquisa mostraram que a desnutrição está associada ao aumento da cárie dental na dentição decídua e permanente.

A associação entre hipoplasia de esmalte e cárie dental na dentição decídua foi determinada em 1.344 crianças chinesas da área rural com idade entre 3 e 5 anos. Foram avaliados os índices CPO-D e CPO-S, bem como o estado nutricional de cada criança, por medidas antropométricas. A prevalência de hipoplasia de esmalte foi de 22,3% e a prevalência de cárie foi de 82,3%. Não houve diferença entre os sexos quanto à experiência de cárie, mas foi observada alta experiência da doença entre crianças de classe sócio-econômica baixa e crianças com baixa estatura para a idade. A presença de crianças com baixo peso ao nascer ou prematuridade ensejou um percentual de cárie levemente maior do que o observado entre crianças que nasceram com peso normal, demonstrando que a deficiência nutricional tem impacto importante na formação dental e na susceptibilidade à cárie. As crianças que apresentaram hipoplasia de esmalte tiveram maior experiência de cárie do que as que não apresentaram tais defeitos, indicando a presença da hipoplasia de esmalte como fator predisponente ao início e progressão de cárie dental, e um fator preditor de maior suscetibilidade à cárie (LI *et al.*, 1996).

Um total de 2.728 crianças sul-africanas de 4 e 5 anos de idade, advindas de uma comunidade rural e três comunidades urbanas foram examinadas, buscando-se relacionar cárie e estado nutricional. Nesse estudo, as crianças da zona rural eram proporcionalmente mais desnutridas do que as da zona urbana. Análise estatística demonstrou diferenças significativas para desnutrição crônica e aguda entre os grupos. Nenhuma associação significativa foi encontrada entre a prevalência de cárie e desnutrição. Portanto, estado nutricional não foi considerado de relevância clínica para prevalência e experiência de cárie (CLEATON-JONES *et al.*, 2000).

2.1.2 Desnutrição e Hipofunção Salivar

Há um pequeno número de estudos investigando desnutrição e hipofunção salivar em seres humanos. Em 1977, McMurry *et al.* indicaram que crianças colombianas desnutridas (grau I= 32, grau II= 9, grau III= 3) tinham redução nos níveis de imunoglobulina A na saliva quando comparadas a crianças normais, o que ocasionou prejuízo na imunidade secretora, embora todas as crianças tenham expressado as mesmas concentrações de proteína salivar total.

Os componentes salivares de crianças egípcias, normais e desnutridas, foram estudados, tendo-se observado que, nos casos edematosos, os componentes salivares estavam aumentados. Nos casos não edematosos grau II, entretanto, estes constituintes encontravam-se diminuídos. Logo, a elevação das proteínas salivares nos casos edematosos pode ser resultado do severo envolvimento glandular (IBRAHIM *et al.*, 1978). Em contrapartida, Agarwal *et al.* (1984) examinando 42 crianças indianas normais e 52 desnutridas, encontraram redução das proteínas salivares com a severidade da desnutrição.

Crianças gambianas desnutridas com idades de 5 a 14 anos, residentes na zona rural, quando comparadas com crianças britânicas de 9 a 10 anos de idade, tiveram níveis salivares de imunoglobulina A diminuídos, sendo esse achado atribuído às diferenças nutricionais entre os grupos estudados (AZZOPARDI; WATSON, 1986).

Johansson *et al.* (1994) estudaram 68 crianças indianas divididas em dois grupos: 1) nutridas ou desnutridas leve e 2) desnutridas moderada ou grave. Os autores confirmaram seus achados anteriores de que crianças com desnutrição moderada ou grave apresentariam menor fluxo de saliva estimulada e redução na capacidade-tampão, mas o fluxo salivar não estimulado não seria afetado. Ao ampliarem a pesquisa no concernente à composição salivar, perceberam que a concentração de proteína total foi semelhante nos dois grupos, mas a quantidade de proteína secretada por minuto estava diminuída em 20% no grupo das crianças desnutridas. Ao analisarem as proteínas separadamente, viram níveis diminuídos de lactoferrina e IgA anti-EGM, bem como atividade diminuída de aglutinina. Em relação aos eletrólitos Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- e PO_4^{3-} , só a concentração de Ca^{2+} e Cl^- estava diminuída no grupo dos desnutridos. Concluíram que crianças desnutridas têm os fatores de defesa imunológicos e aglutinadores prejudicados.

2.2 Saliva

A saliva total humana (STH) é uma mistura complexa de fluídos, com a contribuição das glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual), menores ou acessórias e o fluído gengival crevicular. Além disso, contém grande população de bactérias que residem normalmente na boca, células epiteliais descamadas e resíduos transitórios de comidas ou bebidas, após sua ingestão (EDGAR, 1992; SCHWARTZ *et al.*, 1995). A água representa cerca de 99% da saliva, consistindo o restante, principalmente, de moléculas orgânicas, como proteínas e glicoproteínas (EDGAR, 1992). Quando há predominância, na saliva de moléculas de proteína, a saliva, é serosa, e quando de glicoproteínas (mucina), a saliva é mucosa (DOUGLAS, 2002). A composição salivar é importante pela sua heterogeneidade e variabilidade (KARGÜL *et al.*, 1994), sendo afetada por muitos fatores, como índice do fluxo, estimulação, idade, nutrição, doenças, drogas e hormônios (EDGAR, 1992; FERGUSON, 1987; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995), dos quais o índice do fluxo salivar é o fator de maior importância (LAGERLÖF; OLIVEBY, 1994; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995).

O volume de saliva secretada, em condições basais de repouso, é de cerca de 1mL/min, totalizando volume diário de 1.000 a 1.500mL/dia (DOUGLAS, 2002). A variação do volume salivar decorre da ação dos sistemas nervoso autônomo e endócrino (DOUGLAS, 2002; DOWD, 1999; EDGAR, 1992). A composição salivar, durante a infância, passa por mudanças que refletem o desenvolvimento e maturação das glândulas salivares como parte do desenvolvimento geral dos sistemas corporais. No início da infância, o desenvolvimento do sistema nervoso autônomo é dominante; depois, a maturação hormonal e imunológica passa a refletir na composição salivar. Mudanças na composição sérica, nutrição e estado emocional da criança, que ocorrem com a idade, podem também se refletir na saliva (BEN-ARYEH *et al.*, 1990). Não há diferença, entretanto, na composição salivar quanto ao sexo, tipo de amamentação (natural ou artificial) ou em virtude de erupção dentária (BEN-ARYEH *et al.*, 1984). Seu fluxo em condições de repouso mantém a boca úmida, lubrificando as membranas mucosas (DENNY *et al.*, 1991; DOWD, 1999; EDGAR, 1992; LENANDER-LUMIKARI; LOIMARANTA, 2000; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995), sendo muito importante para a saúde e bem-estar da cavidade oral (BAUGHAN *et al.*, 2000; DOWD, 1999; EDGAR, 1992; LENDENMANN *et al.*, 2000). Este fluxo não estimulado varia consideravelmente durante o dia, sendo influenciado por certo número de fatores, como variação circadiana, luz e excitação, hidratação, exercício e estresse. Em adição, estímulos mais importantes para salivação constituem aqueles associados à alimentação, como movimentos mastigatórios e, principalmente, sabor (EDGAR, 1992). A redução do fluxo salivar e alterações na sua composição salivar causam um desequilíbrio oral clinicamente significativo, manifestado pelo aumento na incidência de cárie, suscetibilidade a candidíase oral, ardência bucal, língua dolorida, dificuldades na fala, mastigação e deglutição, paladar alterado, halitose e xerostomia (FOX *et al.*, 1985). É importante acreditar que o pH salivar é em média 6,8 e depende da relação CO₂ livre/CO₂ combinado (DOUGLAS, 2002).

A saliva é o principal fator do hospedeiro capaz de impedir o desenvolvimento de cárie (FARIAS; BEZERRA, 2003; Van NIEUW AMERONGEN *et al.*, 2004; SIMMONDS *et al.*, 2000; TENOVUO *et al.*, 1986). Seu sistema-tampão neutraliza os ácidos (FARIAS; BEZERRA, 2003; LAGERLÖF; OLIVEBY, 1994; Van NIEUW AMERONGEN *et al.*, 2004); promove a remineralização do esmalte (DENNY *et al.*, 1991; FARIAS; BEZERRA, 2003; LAGERLÖF; OLIVEBY, 1994; Van NIEUW AMERONGEN *et al.*, 2004) e retarda a desmineralização (DENNY *et al.*, 1991; LAGERLÖF; OLIVEBY, 1994; Van NIEUW AMERONGEN *et al.*, 2004). Em contrapartida, seus fatores antimicrobianos são a primeira linha de defesa da cavidade oral (DENNY *et al.*, 1991; FARIAS; BEZERRA, 2003; LAGERLÖF; OLIVEBY, 1994; Van NIEUW AMERONGEN *et al.*, 2004; SIMMONDS *et al.*, 2000); estão presente na película dental e na placa bacteriana (FARIAS; BEZERRA, 2003; SIMMONDS *et al.*, 2000), protegendo contra agressões químicas e físicas (FARIAS; BEZERRA, 2003; Van NIEUW AMERONGEN *et al.*, 2004; SIMMONDS *et al.*, 2000).

2.2.1 Propriedades e Funções da Saliva

Pelas propriedades coligativas da saliva, em especial pela ação adesiva das glicoproteínas (mucinas), pode-se colar partículas previamente quebradas pela ação mecânica da mastigação. A saliva também lubrifica a mucosa bucal, favorecendo o deslizamento do bolo na boca e, logo após a deglutição, seu deslizamento pela mucosa faríngea e esofágica (DOUGLAS, 2002; EDGAR, 1992; MANDEL, 1987; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995). Dentre outras propriedades, a saliva confere a umidade característica das mucosas bucal e faríngea, bem como das vias digestivas superiores em geral (DOUGLAS, 2002; MANDEL, 1987). A lubrificação dos tecidos moles e duros é muito importante para a fala, mastigação, deglutição, para o conforto e para a saúde oral e geral (EDGAR, 1992; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995).

A água da saliva é o solvente no qual se dissolvem as substâncias que estimulam os corpúsculos gustativos, estimulando a secreção salivar que, por conseguinte, remove as partículas estranhas da cavidade bucal por meio da deglutição (DOUGLAS, 2002; EDGAR, 1992; MANDEL, 1987). A saliva também dilui o substrato bacteriano, principalmente diferentes açúcares e mais notadamente a sacarose (LAGERLÖF; OLIVEBY, 1994).

A função digestiva salivar refere-se à ação das enzimas salivares amilase e lipase, sendo a ação da amilase mais importante, por agir sobre os polissacarídeos, amido e glicogênio dos alimentos. Do resultado da ação da ptialina, obtém-se 88% de maltose e 12% de glicose (DOUGLAS, 2002). Assim, a ação da ptialina na boca pode ser benéfica em auxiliar a limpeza do amido ou prejudicial na liberação de maltose para fermentação pelas bactérias orais para formar ácido (EDGAR, 1992; MANDEL, 1987; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995), apesar do efeito em geral na cárie ser ainda incerto (EDGAR, 1992).

2.2.1.1 Ação Neutralizadora da Saliva e Capacidade-Tampão

A saliva é alcalina, sendo um sistema-tampão efetivo, que protege os tecidos orais contra ácidos da comida ou da placa, reduzindo marcadamente o potencial cariogênico dos alimentos (EDGAR, 1992; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995). A capacidade-tampão, tanto da saliva não estimulada quanto da estimulada, envolve três grandes sistemas-tampões: bicarbonato, fosfato e proteínas salivares (EDGAR, 1992; LENANDER-LUMIKARI; LOIMARANTA, 2000), sendo o bicarbonato o principal sistema-tampão salivar (DIAZ-ARNOLD; MAREK, 2002; EDGAR, 1992; LAGERLÖF; OLIVEBY, 1994; LENANDER-LUMIKARI; LOIMARANTA, 2000; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995).

2.2.1.2 Saturação ou Homeostase

A saliva é saturada em relação ao mineral dental, sendo responsável pelo crescimento de cristais de hidroxiapatita durante a fase remineralizadora do processo da cárie. Além disso, cálcio e fosfato salivar são fontes minerais para formação de cálculo. A presença na saliva de inibidores da precipitação de minerais, como estaterina, histidina e PRP, são presumivelmente fatores muito importantes na prevenção da formação excessiva de cálculo na boca. Na placa onde estas proteínas não podem penetrar, no entanto, em razão do grande tamanho de suas moléculas (ou talvez em virtude da proteólise pelas bactérias orais), são inábeis em prevenir a sedimentação e o crescimento dos cristais de fosfato de cálcio, e, por conseguinte a formação do cálculo. A saliva também é fonte de fluoreto para a placa, e para sua captação para o interior da lesão de cárie durante o processo de des-remineralização (EDGAR, 1992; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995).

2.2.1.3 Função Protetora

A saliva possui fatores de defesa específicos e não específicos (EDGAR, 1992; LENANDER-LUMIKARI; LOIMARANTA, 2000; MANDEL, 1987; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995), que mantêm o equilíbrio ecológico da cavidade bucal (TENOVUO; LAGERLÖF, 1995). A defesa específica é realizada pela ação das imunoglobulinas e por propriedades opsonizantes e leucotáxicas, favorecendo a chegada e ação dos leucócitos (DOUGLAS, 2002). Já a defesa inespecífica é realizada principalmente pelas peroxidases, lisozimas, lactoferrinas e histatinas (EDGERTON; KOSHLUKOVA, 2000; LENANDER-LUMIKARI; LOIMARANTA, 2000), que agem limitando o crescimento bacteriano ou fúngico, interferindo no metabolismo da glicose e/ou promovendo agregação das bactérias, viabilizando a eliminação dos microorganismos da cavidade oral (LENANDER-LUMIKARI; LOIMARANTA, 2000).

2.2.1.4 Formação da Película Adquirida

A matriz da película adquirida contém proteínas oriundas da saliva (EDGAR, 1992; LENDENMANN *et al.*, 2000; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995), bem como proteínas de origem bacteriana (EDGAR, 1992; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995) e do fluido crevicular também estão presentes (EDGAR, 1992). A formação desta película é um processo físico-químico que envolve a seleção e adsorção sequencial de glicoproteínas salivares na superfície dentária (EDGAR, 1992). As proteínas de mais alta afinidade parecem ser o grupo das PRP (EDGAR, 1992; LENDENMANN *et al.*, 2000), seguida pela cistatina e lisozima (LENDENMANN *et al.*, 2000).

A película adquirida protege os dentes contra agressões químicas e mecânicas (EDGAR, 1992; LENANDER-LUMIKARI; LOIMARANTA, 2000; LENDENMANN *et al.*, 2000; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995). Age, entretanto, como substrato para colonização por bactérias (AL-HASHIMI; LEVINE, 1989; EDGAR, 1992; LENDENMANN *et al.*, 2000; ØRSTAVIK; FREDERICK, 1973; SIMMONDS *et al.*, 2000; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995), muitas das quais têm desenvolvido mecanismos de ligação envolvendo a síntese de adesinas, moléculas que se ligam ao grupo oligossacarídeo das glicoproteínas (EDGAR, 1992; SIMMONDS *et al.*, 2000). Outros organismos ligam-se por meio da síntese de glucanos ou pela enzima glicosil-transferase da película (EDGAR, 1992; LENDENMANN *et al.*, 2000).

2.2.1.5 Formação da Placa

A formação da placa bacteriana ou biofilme envolve a incorporação de proteínas salivares (EDGAR, 1992; RUDNEY, 2000). A matriz protéica da placa pode ter papel estrutural limitado na capacidade de manter a agregação da placa, porém mais importante do que a promoção da coesão é a síntese de glucanos extracelulares (EDGAR, 1992).

Proteínas salivares formam um filme condicionante em todas as superfícies orais, o que contribui para uma seleção positiva na aderência microbiana. Espécies de bactérias podem ter o estabelecimento no biofilme inibido por mecanismos como limpeza por agregação ou morte por proteínas antibacterianas. Por outro lado, o filme condicionante de proteínas salivares na superfície oral permite a seleção positiva, favorecendo a aderência, ou seja, o primeiro estágio na formação do biofilme (RUDNEY, 2000; SCANNAPIECO *et al.*, 1995). A adesão por si só, contudo, não tem efeito definitivo no mecanismo que causa a doença em alguns indivíduos (CASTRO *et al.*, 2006).

2.3 Composição Salivar

A saliva é uma solução aquosa que tem como solvente a água e substâncias orgânicas e inorgânicas em solução levemente hipotônica (DOUGLAS, 2002).

2.3.1 Componentes Inorgânicos

Os elementos inorgânicos mais importantes presentes na saliva são: iodeto, brometo (DOUGLAS, 2002), sódio, potássio, cálcio, fósforo, cloreto, fluoreto, bicarbonato (DOUGLAS, 2002; EDGAR, 1992) e tiocianato (EDGAR, 1992). Os íons maiores (sódio,

potássio, cloreto e bicarbonato) são os contribuintes principais para a osmolaridade da saliva, que é aproximadamente a metade da do plasma (EDGAR, 1992). No primeiro ano de vida, a concentração salivar de sódio é alta logo após o nascimento, e diminui com a idade, ocorrendo o mesmo com o potássio e o cloro. A partir do segundo ano, sódio salivar apresentará aumento com a idade, não havendo diferença entre os sexos (BEN-ARYEH *et al.*, 1990). Já a concentração de cálcio e magnésio mantém-se elevada durante todo o 1º ano, enquanto a concentração de fosfato e o pH são baixos ao nascer e aumentam com a idade (BEN-ARYEH *et al.*, 1984).

O fluoreto é o mais efetivo agente anticárie conhecido (LAGERLÖF; OLIVEBY, 1994). Quando presente na fase aquosa, durante a fase re- do processo des-remineralização, será incorporado aos cristais de esmalte e tornará o esmalte mais resistente à desmineralização (LARSEN, 1974). O conteúdo de fluoreto na saliva é aproximadamente semelhante ao do plasma, mas é levemente aumentado naqueles que bebem água fluoretada ou usam dentifício fluoretado. Acredita-se que, estas pequenas elevações nos níveis salivares dos fluoretos são muito importantes na ação anticárie (EDGAR, 1992).

Nem todo cálcio e fosfato presentes na saliva estão livres em solução. Enquanto parte do cálcio se encontra ligada a proteínas, a outra parte formará complexos solúveis com carbonato, fosfato ou lactato. Dez por cento dos fosfatos estão na forma éster, principalmente fosfoproteínas, mas o pirofosfato também se encontra presente. Os níveis de cálcio e fosfato tornam a saliva supersaturada em relação à hidroxiapatita no pH bucal normal (EDGAR, 1992), e a concentração de cálcio dependerá do fluxo salivar (TENOVUO; LAGERLÖF, 1995).

2.3.2 Componentes Orgânicos

Os principais constituintes orgânicos da saliva são as proteínas, compreendendo aproximadamente 200mg/100mL (EDGAR, 1992). A concentração total de proteína salivar, aumenta linearmente com a idade (BEN-ARYEH *et al.*, 1990).

2.3.2.1 Proteínas Salivares

a) Imunoglobulinas

As imunoglobulinas A (IgA), A secretora, G (IgG) e M (IgM) formam a base da defesa específica salivar contra a microbiota oral, incluindo a defesa contra EGM (LENANDER-LUMIKARI; LOIMARANTA, 2000; RUSSELL *et al.*, 1999). Juntos esses anticorpos constituem de 5-15% das proteínas salivares (Van NIEUW AMERONGEN *et al.*, 2004), podendo ligar-

se à película salivar e também ser encontrados na placa dental (RUSSELL *et al.*, 1999). Na cavidade oral, agem neutralizando vários fatores microbianos virulentos, limitando a aderência microbiana e aglutinando bactérias, bem como prevenindo a penetração de antígenos estranhos na mucosa (LENANDER-LUMIKARI; LOIMARANTA, 2000; SIKORSKA *et al.*, 2002).

IgA representa o principal anticorpo encontrado na saliva (20mg/100mL) (DOUGLAS, 2002; EDGAR, 1992; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995), existindo neste fluido sob duas formas em quantidades iguais: IgA1 e IgA2. Essas imunoglobulinas são produzidas por células plasmáticas localizadas nas glândulas salivares maiores e menores, e então transportadas para a saliva pelas células dos ductos glandulares. A IgA pode ligar-se ao EGM, facilitando a agregação e eliminação deste grupo de bactérias da cavidade bucal (DOWD, 1999). Pode também ser detectada na saliva de recém-nascidos 7 dias após o parto; embora sua concentração seja baixa em bebês de 1 ano de idade (BEN-ARYEH *et al.*, 1984), sua concentração na saliva aumenta com a idade (BEN-ARYEH *et al.*, 1990).

A IgA secretora é uma proteína de defesa que inibe a entrada de patógenos no trato gastrintestinal (DOWD, 1999) e a aderência de certas bactérias ao esmalte dental (DOWD, 1999; RUSSELL *et al.*, 1999; SIKORSKA *et al.*, 2002). A habilidade da IgA secretora em inibir a aderência bacteriana parece relacionar-se à habilidade em ligar-se à superfície adesiva da bactéria, bem como em neutralizar a carga negativa da superfície (DOWD, 1999) ou mesmo inibir a atividade metabólica bacteriana (RUSSELL *et al.*, 1999; SIKORSKA *et al.*, 2002). Pode-se, então, dizer que a IgA é uma classe de anticorpos polivalentes que podem prevenir os efeitos adversos de toxinas e enzimas bacterianas (DOWD, 1999).

A IgG, de origem materna, só é detectável na saliva de recém-nascidos. A concentração de IgG (1-5mL/100ml) (DOUGLAS, 2002; EDGAR, 1992) diminui em níveis não detectáveis após alguns meses, mas aparece novamente após erupção dental, e acredita-se ter potencial para modular a colonização oral pelas bactérias formadoras de placa durante a erupção dentária (TENOVUO; LAGERLÖF, 1995). Esta imunoglobulina só é encontrada no fluido crevicular, de forma semelhante à IgM (0-2mg/100mL/) (DOUGLAS, 2002; EDGAR, 1992).

b) Glicoproteínas

Quase todas as proteínas salivares são glicoproteínas (TENOVUO; LAGERLÖF, 1995), sendo por definição macromoléculas formadas pela combinação de proteínas e carboidratos (DOUGLAS, 2002). As principais glicoproteínas são as mucinas (GM1 e GM2) encontradas na saliva das glândulas submandibular e sublingual, e as proteínas ricas em prolina (PRP), encontradas na saliva da glândula parótida (DOUGLAS, 2002; DOWD, 1999).

c) Mucinas

Determinam a característica da secreção mucosa, especialmente pela sua alta viscosidade, que confere muitas das características físico-químicas da saliva e suas funções. A GM1 humana é de tamanho maior do que 1.000kD, sendo composta de vários monômeros numa estrutura oligomérica, enquanto a GM2 tem peso molecular de cerca de 120kD. São secretadas pelas glândulas salivares submandibular e sublingual e por glândulas salivares menores (BAUGHAN *et al.*, 2000). O alto peso molecular que as mucinas possuem, particularmente GM1, possibilita múltiplas funções de ligação dessas moléculas (DOWD, 1999).

GM1 são adsorvidas firmemente na superfície do dente, formando um filme insolúvel, sem estrutura orgânica, chamada película adquirida, com base na qual se forma a placa dentária, pela ação bacteriana que se desenvolve na película (DOUGLAS, 2002; DOWD, 1999), sendo também importantes na lubrificação dos tecidos moles e dentes na cavidade oral (TABAK *et al.*, 1985). Em contrapartida, GM2 também pode-se ligar à superfície dentária, mas é facilmente deslocada. Uma das principais funções é a promoção de limpeza de bactérias orais por agregação, incluindo EGM. Esta habilidade de causar agregação está diretamente relacionada à promoção de resistência à cárie (DOWD, 1999; LEVINE *et al.*, 1978; MURRAY *et al.*, 1982).

É recorrentemente demonstrado o fato de que, enquanto a GM1 predomina na saliva de indivíduos cárie-suscetíveis, enquanto o nível de GM2 parece ser consideravelmente alto na saliva de indivíduos cárie-resistentes (LENANDER-LUMIKARI; LOIMARANTA, 2000). Na saliva não estimulada, GM2 são os principais componentes, constituindo 20-30% das proteínas totais (Van NIEUW AMERONGEN *et al.*, 2004), estando também envolvidas na proteção contra vírus (BOLSCHER *et al.*, 2002).

d) Proteínas Ricas em Prolina (PRP)

PRP contribuem significativamente para proteção da superfície do esmalte, em razão da alta afinidade de ligação com a hidroxiapatita. Constituindo cerca de 15-20% de todas as proteínas salivares (Van NIEUW AMERONGEN *et al.*, 2004), elas representam grande percentual do conteúdo protéico total salivar da parótida e da submandibular, sendo produtos da secreção de células acinosas, onde a glândula parótida secreta a maior quantidade desta glicoproteína (DOWD, 1999).

A PRP ácida liga-se com firmeza à hidroxiapatita e previne a precipitação do fosfato de cálcio da saliva supersaturada, desse modo, protegendo a superfície do esmalte e prevenindo desmineralização (TENOVUO; LAGERLÖF, 1995). Sua presença em alta quantidade na saliva e sua alta afinidade de ligação à hidroxiapatita são indicadores de sua relativa importância

(LAMKIN *et al.*, 1996). Outra função relevante é a sua capacidade em ligar-se às bactérias orais, incluindo EGM (GIBBONS; HAY, 1989).

A secreção de PRP é melhorada por estimulação de receptores adrenérgicos nas glândulas salivares maiores (BEDI, 1993), logo, o nível de estimulação deste receptor é um determinante da concentração de PRP na saliva. Portanto, drogas que agem nos receptores adrenérgicos poderiam afetar o grau de aderência da bactéria oral à superfície dental (KOUSVELARI *et al.*, 1988). A habilidade da PRP em viabilizar a aderência de certas bactérias à superfície dental é descrita como de maior importância do que sua habilidade de agregação e eliminação das bactérias orais (DOWD, 1999).

e) Lisozima

Trata-se de uma glicoproteína cuja ação fundamental é bacteriolítica, capaz de eliminar grandes quantidades de microorganismos orais (DOUGLAS, 2002), pois inibe o metabolismo bacteriano, levando inicialmente à parada da reprodução e depois à própria destruição da bactéria (DOUGLAS, 2002; DOWD, 1999; EDGAR, 1992; Van NIEUW AMERONGEN *et al.*, 2004). A secreção salivar que contém mais lisozimas é a parotídeana. As bactérias mais sensíveis à ação de lisozima são estafilococos, estreptococos, proteus e brucella; sendo seu efeito antimicrobiano extensivo contra EGM (DOWD, 1999).

Por serem carregadas positivamente, as lisozimas se ligam a ânions salivares de vários tipos, incluindo bicarbonato, fluoreto, iodeto e nitrato, ligando o complexo à membrana celular e desestabilizando a membrana pela catalização da hidrólise da ligação glicosídica no componente polissacarídeo da parede que permite que ocorra autólise (DOWD, 1999; EDGAR, 1992). Também podem alterar a glicólise em bactérias sensíveis e, em alguns casos, causar agregação, contribuindo para limpeza da bactéria da cavidade oral. A habilidade de ligar-se à hidroxiapatita sugere uma função antimicrobiana na superfície dental (DOWD, 1999). Essas proteínas estão presentes nos recém-nascidos em níveis iguais aos encontrados nos adultos, podendo exercer atividades antimicrobianas antes da erupção dos dentes (TENOVUO; LAGERLÖF, 1995).

f) Lactoferrina

É uma glicoproteína ligada ao ferro, com atividade antimicrobiana na cavidade oral (BELLAMY *et al.*, 1993; DOWD, 1999; EDGAR, 1992). Seu mecanismo de ação acontece por meio da ligação a dois átomos de ferro por molécula evitando que o ferro seja usado por organismos que necessitem dele para seu metabolismo (DOWD, 1999; EDGAR,

1992; LAGERLÖF; OLIVEBY, 1994; MANDEL, 1987; Van NIEUW AMERONGEN *et al.*, 2004; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995). Os organismos mais suscetíveis à ação da lactoferrina são bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas. O crescimento do EGM é sensível à lactoferrina, e sua inibição parece ser ferrodpendente (LASSITER *et al.*, 1987; SIKORSKA *et al.*, 2002; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995). Além disso, lactoferrina parece ter uma atividade antimicrobiana que independe da sua habilidade de se ligar ao ferro (DOWD, 1999; SIKORSKA *et al.*, 2002). Embora esta glicoproteína tenha atividade antimicrobiana direta, não tem sido demonstrado estar diretamente relacionada à diminuição na incidência de cárie, sugerindo que a contribuição da saliva na proteção contra as cáries é de associação entre vários componentes salivares (DOWD, 1999; SIKORSKA *et al.*, 2002; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995).

g) Sistema Peroxidase

O sistema peroxidase na saliva compreende duas enzimas (peroxidase salivar e mieloperoxidase), os íons tiocianato e peróxido de hidrogênio (TENOVUO; LAGERLÖF, 1995). Tem sido atribuído ao tiocianato o efeito de elevar a ação antibacteriana da sialoperoxidase (EDGAR, 1992). Peroxidase salivar é um tipo de peroxidase produzida pelas células acinares de algumas glândulas salivares maiores. Semelhante a outras peroxidases, a enzima contém um grupo heme e faz uso do tiocianato e peróxido de hidrogênio produzido pela bactéria oral, ou presentes na secreção glandular, para catalizar a formação de hipotiocianato e possível ácido sianosulfúrico (DOWD, 1999; EDGAR, 1992; EDGERTON; KOSHLUKOVA, 2000; MANDEL, 1987; Van NIEUW AMERONGEN *et al.*, 2004; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995). Hipotiocianato oxida o grupo sulfidril da bactéria oral, resultando, entre outras coisas, na inibição do metabolismo glicolítico bacteriano. A presença de peróxido de hidrogênio e de tiocianato na glândula salivar indica que as glândulas salivares maiores liberam substrato para a reação, entretanto, bactérias orais também produzem peróxido de hidrogênio e peroxidase (DOWD, 1999). A mieloperoxidase é uma proteína derivada do leucócito, cuja concentração na saliva depende das inflamações na gengiva e na mucosa (TENOVUO; LAGERLÖF, 1995). Hipotiocianato é um componente normalmente presente na saliva de crianças, mesmo sem dentição (TENOVUO; LAGERLÖF, 1995).

O peróxido de hidrogênio possui mais toxicidade do que o hipotiocianato, tanto para as bactérias como para a mucosa oral. As peroxidases protegem assim tanto a cavidade oral como as bactérias orais do forte efeito de oxidação do peróxido (TENOVUO; LAGERLÖF, 1995). Peróxido de hidrogênio possibilita capacidade de oxidar o ácido siálico residual nas glicoproteínas salivares, com resultante perda da habilidade de agregar bactérias. Bactérias orais variam em sensibilidade ao hipotiocianato, tendo o EGM como o mais sensível dos microorganismos. A glicólise do EGM é, portanto, inibida em baixas concentrações de hipotiocianato, dando esta reação origem a produtos tóxicos à cavidade oral (DOWD, 1999).

Peroxidase e lisozima inibem a aderência de pelo menos uma espécie de EGM à hidroxiapatita na película salivar (LUMIKARI *et al.*, 1991). A presença de peroxidase, lisozima e lactoferrina na placa dental parecem estar relacionadas à mudança na composição bacteriana presente na placa, mas sua importância em relação à cárie não é conhecida (DOWD, 1999).

h) Aglutinina

Aglutinina salivar foi no princípio caracterizada como glicoproteína aglutinadora de EGM isolada da saliva da parótida (CARLÉN; OLSSON, 1995; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995), mas também está presente na saliva oriunda das glândulas submandibular e na sublingual (BIKKER *et al.*, 2002). Essas glicoproteínas têm a capacidade de interagir com bactéria não acoplada, resultando num grande grupo de bactérias agregadas, eliminadas em seguida pela deglutição (TENOVUO; LAGERLÖF, 1995).

i) Histatina

As histatinas são proteínas ricas em histidina produzidas pelas células acinares das glândulas salivares, estando entre as menores proteínas presentes na saliva. Além do demonstrado efeito antifúngico, não diretamente relacionado ao processo cariioso, as histatinas têm efeito antibacteriano (DOWD, 1999; EDGERTON; KOSHLUKOVA, 2000), bem como habilidade para influir na remineralização. Existem várias histatinas na saliva, com designações numéricas – histatina1, histatina2, assim por diante; as formas mais importantes na cavidade oral são a histatina1, 3 e 5. Alguns estudos mostram um efeito antibacteriano das histatinas contra EGM na cavidade oral (MORENO *et al.*, 1978). A função mais importante da histatina é a de prevenir a precipitação do fosfato de cálcio da saliva supersaturada e inibir o crescimento do cristal, desse modo, melhorando a estabilidade da hidroxiapatita presente na superfície dentária (DRISCOLL *et al.*, 1995; RICHARDSON *et al.*, 1993), ação realizada de forma semelhante à das PRP (DOWD, 1999).

Degradação proteolítica e outras modificações químicas das histatinas podem alterar sua habilidade de ligar-se à superfície do esmalte. Fosforilação da histatina1, por exemplo, aumenta a habilidade de ligação à hidroxiapatita, já que conceitualmente carga altamente negativa é importante na ligação à superfície do esmalte (DRISCOLL *et al.*, 1995).

j) Estaterina

É uma fosfoproteína com baixo peso molecular (DOWD, 1999; EDGAR, 1992). Constitui um peptídeo ácido que contém relativamente altos níveis de prolina, tirosina e

fosfoserina. A carga negativa residual fornece locais de ligação à hidroxiapatita (TENOVUO; LAGERLÖF, 1995). Estaterina inibe espontaneamente a precipitação dos sais de fosfato de cálcio da saliva supersaturada e previne o crescimento do cristal (EDGAR, 1992; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995), favorecendo a remineralização da superfície dentária sem formação de cálculo mineral tanto nas glândulas salivares como na superfície dentária (EDGAR, 1992). A estaterina possui habilidade para funcionar com outras proteínas salivares protegendo a superfície dentária da desmineralização. Serve também como lubrificante para a superfície dentária, protegendo do desgaste provocado por vários agentes físicos (DOUGLAS *et al.*, 1991). Ademais, a estaterina pode também se ligar à bactéria, melhorando sua ligação da bactéria cariogênica à superfície dental. Esta ligação melhorada poderia promover indiretamente a atividade de cárie, e há alguma evidência mostrando isso, mas o efeito total de sua ação na ligação da bactéria permanece por ser estabelecido (DOWD, 1999).

l) Cistatina

É um grupo de inibidores de protease ricos em cisteína. Como inibidores da protease, elas previnem a ação das proteases potencialmente prejudiciais aos tecidos moles da cavidade oral. As cistatinas também se ligam à hidroxiapatita, entretanto, a proteína ácida contendo cisteína inibe a precipitação do fosfato de cálcio da saliva supersaturada, protegendo à superfície dentária da formação de cálculo (JOHNSON *et al.*, 1993). A maioria das cistatinas presentes na saliva são possivelmente produtos da secreção das glândulas submandibulares. Sua presença nas células acinares das glândulas parótida e submandibular é aumentada por tratamento a longo prazo com receptores agonistas β -adrenérgicos (BEDI, 1993). Terapia com receptores agonistas ou antagonistas β -adrenérgicos portanto, poderia ter efeito significativo nas funções promovidas pelas cistatinas, semelhante ao que ocorre com PRP (DOWD, 1999).

m) α -Amilase

Também conhecida como ptialina, é a maior enzima digestiva da saliva, fruto da secreção salivar da parótida (60-120mg/100mL) e da submandibular (25mg/100mL) (EDGAR, 1992; MANDEL, 1987). Essa enzima hidrolisa as ligações α 1:4 dos polissacarídeos (amido e glicogênio). O pH ótimo para sua ação é 6,8 e requer íons cloreto e cálcio para sua ação enzimática. Existem de 6 a 8 formas de isoenzimas (DOUGLAS, 2002; EDGAR, 1992).

A concentração da amilase na saliva é nitidamente influenciada pelo padrão alimentar, sendo mais elevada em grupos populacionais em que a dieta é predominantemente constituída de amido (COLLARES *et al.*, 1979), no entanto, alimentação infantil contendo amido, não parece influenciar o aparecimento de amilase em bebês (BEN-ARYEH *et al.*, 1984; SEVENHUYSEN

et al., 1984), indicando um ritmo de desenvolvimento que independe do alimento consumido (BEN-ARYEH *et al.*, 1984). A introdução de alimentos contendo amido antes dos 3 meses de idade, porém, provavelmente levaria a uma inadequada hidrolisação do amido em alguns bebês (SEVENHUYSSEN *et al.*, 1984). A amilase salivar está em concentração baixa na saliva do recém-nascido (COLLARES *et al.*, 1979; BEN-ARYEH *et al.*, 1984; SEVENHUYSSEN *et al.*, 1984), elevando-se, posteriormente, até valores próximos aos valores observados em crianças maiores, entre o 3º (BEN-ARYEH *et al.*, 1984; SEVENHUYSSEN *et al.*, 1984), o 6º e o 12º mês de vida; já a secreção da enzima que apresenta níveis baixos ao nascimento eleva-se rapidamente de tal forma que aos 60 dias de vida já se encontra a níveis superiores (COLLARES *et al.*, 1979). Foi previamente observado que a amilase salivar aumenta com a idade, mesmo após a adolescência (BEN-ARYEH *et al.*, 1990).

Amilase salivar pode ter importante papel na colonização e metabolismo de estreptococos, principalmente na formação de placa dental e cáries (AL-HASHIMI; LEVINE, 1989; ØRSTAVIK; FREDERICK, 1973).

n) Lipase Salivar

Age com pH levemente ácido e quebra triglicérides, libera ácidos graxos, que parecem governar o peristaltismo do corpo gástrico e do antro pilórico, controlando de modo relevante o esvaziamento gástrico (DOUGLAS, 2002).

o) Sialina

É um tetrapeptídeo (glicina-glicina-lisina-arginina) que pode ser utilizado por várias bactérias, principalmente na formação de produtos finais alcalinos, que parecem ajudar na regulação do pH da placa (EDGAR, 1992; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995).

2.3.3 Fatores que Influenciam a Composição Salivar

a) Índice do fluxo salivar

É o fator de maior importância capaz de afetar a composição salivar (LAGERLÖF; OLIVEBY, 1994; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995). À medida que o fluxo salivar aumenta, as concentrações de proteínas, sódio, cálcio, cloreto e bicarbonato aumentam em níveis variados, enquanto os níveis de fosfato e magnésio diminuem (EDGAR, 1992; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995).

Hipossalivação pode ser causada por fatores locais, por conseguinte doença ou destruição da glândula salivar (DIAZ-ARNOLD; MAREK, 2002; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995) e radioterapia na região da cabeça e do pescoço (TENOVUO; LAGERLÖF, 1995), ou por fatores sistêmicos, como, por exemplo, doenças autoimunes, desequilíbrio hormonal, desequilíbrio neurológico, fatores psicológicos, drogas (DIAZ-ARNOLD; MAREK, 2002; TENOVUO; LAGERLÖF, 1995), desnutrição ou anorexia (TENOVUO; LAGERLÖF, 1995).

b) Contribuições de Glândulas Diferentes

Na saliva total não estimulada, a glândula parótida contribue apenas com cerca de 10% do volume, enquanto na saliva estimulada sua secreção se faz predominante. Assim, a composição da saliva mista aproxima-se da saliva parotídeana, quando o volume do fluxo aumenta. Como a concentração de cálcio na saliva parotídeana é mais baixa do que na saliva submandibular, saliva total estimulada freqüentemente contém menores níveis de cálcio do que a não estimulada (EDGAR, 1992).

c) Ritmo Circadiano

Variações no ritmo circadiano podem alterar a concentração de vários constituintes salivares (EDGAR, 1992). Quase todas as substâncias apresentam variação considerável durante o dia, que dependerá da variação do índice do fluxo salivar (HOEK *et al.*, 2002). O pico da concentração dos vários constituintes salivares pode ser várias vezes mais alto do que o valor mínimo (TENOVUO; LAGERLÖF, 1995). Embora os níveis de íons cálcio e fosfato sejam baixos no início da manhã (EDGAR, 1992), o cálcio tem seu pico no período da tarde duas vezes mais alto do que os valores mínimos observados (TENOVUO; LAGERLÖF, 1995). O volume secretado de saliva também segue o ritmo circadiano, diminuindo durante o sono e aumentando durante as horas acordadas (DAWES, 1987).

d) Influência dos Estímulos Sobre a Secreção Salivar

A saliva colhida durante os primeiros minutos possui composição diferente da colhida após 15 minutos de estímulo constante (TENOVUO; LAGERLÖF, 1995), portanto, não deve haver demora durante a coleta de saliva para realização de dosagens de seus componentes. Escovação dental sem dentifrício leva a um aumento transitório da secreção salivar, não induzindo mudanças significantes na concentração total de proteínas, mas aumentando a concentração de albumina e diminuindo a concentração de IgA (HOEK *et al.*, 2002).

e) Dieta

Mudanças a longo prazo na dieta não parecem ter efeito dramático na composição salivar, mas mudanças da concentração de fosfato e uréia no plasma induzida por alterações dietéticas podem ser refletidas na saliva (EDGAR, 1992).

2.3.4 Sistema Salivar na Infância

Tenovou *et al.* (1986), comparando os fatores antimicrobianos salivares de crianças (0,8 a 3,8 anos) com adultos, não encontram diferenças entre os níveis de lisosima, peroxidase e hipotiocianato. A concentração de lactoferrina e de tiocianato, entretanto, foi 1/3 da encontrada nos adultos. Além disso, a atividade da mieloperoxidase e da amilase e a quantidade das imunoglobulinas e das proteínas contidas na saliva total estavam diminuídas nas crianças. Não houve diferenças entre os sexos em nenhum dos parâmetros estudados. Os autores concluíram que, na infância, o sistema salivar não imunológico, exceto a lactoferrina e a mieloperoxidase, possui os mesmos níveis do adulto, no entanto, como esse sistema é responsável por muitas propriedades antimicrobianas, a infância passa a ser um período crítico, já que o sistema salivar imunológico ainda está imaturo.

Hyypä *et al.* (1989), dando continuidade ao estudo de Tenovuo *et al.* (1986), observaram que a concentração de lisosima e lactoferrina em saliva total não mudou entre as fases pré-dental e dental, quando comparada a concentração em adultos, encontrando-se ligeiramente reduzida nas crianças. A atividade da peroxidase foi maior nas crianças em fase pré-dental do que nas crianças após erupção dentária e nos adultos. A atividade da mieloperoxidase e os íons tiocianatos aumentaram linearmente com a idade, entretanto, os níveis de hipotiocianato foram idênticos em todos os grupos. IgA foi significativamente menor em crianças, mas a IgG aumentou linearmente com a idade. A quantidade de proteínas total não diferiu entre as crianças, mas estava significativamente maior nos adultos. Os resultados indicaram que os níveis da maioria dos antimicrobianos salivares não foram objeto de alteração com a erupção dentária, demonstrando a imaturidade do sistema antimicrobiano salivar nas crianças.

Em 1990, Ben-Aryeh *et al.*, examinando bebês, crianças, adolescentes e adultos, quanto às concentrações de Na, K, proteínas totais e IgA, bem como a atividade da IgA e da amilase, observaram uma ascensão linear com a idade para a concentração de Na e de proteínas totais e para a atividade da IgA e da amilase. A composição da saliva mudou significativamente durante a infância, implicando desenvolvimento e maturação das glândulas salivares.

Estudando 57 crianças entre 3 e 13 anos de idade, Kargül *et al.* (1994) dividiram-nas em três grupos, de acordo com as dentições decídua, mista e permanente. Os autores encontraram

maior concentração de Na e Mg na dentição mista; entretanto, não observaram diferenças entre os grupos nas concentrações de Ca, K, P e Cl. Proteína total foi menor na dentição decídua, no entanto, quanto analisando bandas protéicas, algumas bandas protéicas aumentam, outras diminuem e outras não se alteram com a idade. Proteína total aumenta linearmente com número de superfícies cariadas.

Dezan *et al.* (2002), todavia, estudando crianças de 18 a 42 meses, não observaram diferença no fluxo salivar quanto ao sexo, mas verificaram aumento com a idade. A quantidade de proteínas totais não alterou com a idade nem com o sexo, ao passo que a atividade da amilase salivar foi maior nos meninos de 18 a 30 meses, havendo tendência a uma diminuição no ácido siálico em relação à idade para ambos os sexos, sugerindo redução na síntese e secreção de glicoproteínas salivares.

Procurando comparar a composição orgânica da saliva em crianças com e sem cárie, Farias e Bezerra (2003) analisaram concentração de proteínas totais, imunoglobulinas e atividade da amilase. Crianças com cárie apresentaram níveis elevados de IgA e IgG, mas a concentração de proteínas totais, atividade da amilase e concentração de IgM não apresentaram diferenças entre os grupos.

Durante o primeiro ano de vida das crianças, o ambiente oral passa por várias mudanças que coincidem com a erupção dentária. Assim, Ruhl *et al.* (2005) acompanharam 10 bebês a partir de um mês de nascidos até a idade de 1 ano, com o objetivo de observar mudanças na composição protéica salivar. As proteínas apresentaram um padrão constante, não sendo alteradas com as erupções dentárias, exceto a albumina, que aumentou na concentração um mês antes da erupção do primeiro dente, e as mucinas, pois GM2 foi mais abundante no início, enquanto GM1 teve níveis mais elevados no final do primeiro ano.

2.4 Cárie e EGM

Os EGM pertencem ao grupo *viridans* e são considerados os principais responsáveis pela patogenia da cárie dental (RUOFF *et al.*; 2003; WINN JR *et al.*, 2005). Este grupo de bactérias é Gram-positivo; anaeróbio facultativo, sendo seu crescimento estimulado em atmosfera rica em CO₂; mediante a fermentação de manitol e sorbitol, produzindo glucanos extracelulares provenientes da sacarose, com produção de ácido láctico como principal produto final do processo de fermentação, não ocorrendo nesse mecanismo a produção de gás; sendo também catalase-negativo (RUOFF *et al.*, 2003; WINN JR *et al.*, 2005) e oxidase-negativo (WINN JR *et al.*, 2005); possuindo forma esférica ou oval com menos de 2µm de diâmetro.

A habilidade em produzir enzimas chamadas glucosiltransferase, que hidrolisa a sacarose, formando glucanos insolúveis, possibilita a aderência dos EGM na superfície lisa dos dentes, formando a matriz da placa dental, com subsequente formação de ácido para

desmineralizar o esmalte dental e iniciar a lesão de cárie. Outros estreptococos *viridans* sintetizam polissacarídeos, mas só os EGM potencializam a colonização oral pela presença da sacarose. Esses microorganismos também sintetizam polissacarídeos intracelulares que podem ser metabolizados, fornecendo ácidos na ausência de carboidratos externos (WINN JR *et al.*, 2005).

Os EGM formam um grupo com sete espécies com heterogeneidade sorológica e genética: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. downei*, *S. macacae*, *S. ferus* (WINN JR *et al.*, 2005). Em 1924, Clarke isolou bactérias de lesões cariosas em humanos e as chamou de EGM por serem estreptococos que tinham características diferentes. Quando cresciam em meio neutro ou alcalino tinham a forma de cocos, no entanto quando o meio acidificava, assumiam a forma de bacilos, parecendo ter uma forma mutante. Relatou que os EGM pareciam estar constantemente presentes em lesões cariosas iniciais, sendo potentes produtores de ácido. Em cáries artificiais, os EGM mostraram ser hábeis para descalcificar o esmalte e penetrar a dentina. Embora tenha associado o EGM com a cárie dental, outros investigadores não foram capazes de encontrá-los em lesões de cárie e essas bactérias ficaram esquecidas por muito tempo. Foram redescobertas na década de 1960, quando investigadores procuraram identificar os estreptococos causadores de infecções dentárias em ratos (KEYES, 1968).

Em 1960, Keyes, realizando experimentos em ratos, observou o caráter infeccioso e transmissível da doença cárie, porquanto a flora responsável pela doença era sensível à penicilina e na presença de uma dieta rica em carboidratos, desenvolvia a doença de forma rápida e agressiva. Esses achados foram confirmados no mesmo ano por Fitzgerald e Keyes, que enfatizaram o aspecto multifatorial da doença, em que composição da dieta, maturação dental e microorganismos desempenhariam importante papel. Com esses achados, Keyes (1962) elaborou a sua famosa tríade, onde para que houvesse o desenvolvimento da doença cárie, eram necessárias a presença e a interação de três fatores: o hospedeiro, a microflora e o substrato oral.

A habilidade que microorganismos causadores da cárie possuem de produzir dextrano extracelular com suporte na sacarose sugerem que esse é um fator importante na formação da placa cariogênica (FITZGERALD, 1968). Assim, o hábito de numerosos lanches ricos em açúcar favorece a atividade de cárie (KEYES, 1968). Uma vez que os investigadores fizeram amostras de placas de lesões cariosas ou da saliva de pacientes com cáries, o EGM passou a ser rotineiramente associado com a cárie dental humana (LOESCHE, 1986).

O crescente interesse em pesquisar os EGM como agente etiológico da cárie levou à criação de um método de isolamento mais preciso. Assim, em 1973, Gold *et al.* desenvolveram um meio seletivo para EGM. O ágar mitis salivarius foi utilizado como meio-base, após a descoberta de que este meio, seletivo para estreptococos bucais, seria nutricionalmente adequado e não inibiria o crescimento dos EGM. Os autores testaram diversas concentrações de sacarose capazes de inibir o crescimento de outros estreptococos de amostras de placa bacteriana. A concentração de 20% inibia os *S. sanguis* e *S. mitis*, mas não os *S. salivarius*. A descoberta,

alguns anos antes, de que os EGM seriam resistentes ao antibiótico bacitracina, permitiu que diversas concentrações dessa substância fossem testadas no meio de cultura. A adição de 0,2 unidades de bacitracina por mililitro de meio foi suficiente para a completa eliminação dos *S. salivarius* e *S. mitis*, mas não dos *S. sanguis*. Nem a sacarose, nem a bacitracina, quando utilizadas nessas concentrações, interferiram no crescimento dos EGM. Assim, a combinação de sacarose a 20% e 0,2 unidade de bacitracina por mililitro de ágar mitis salivarius foi efetiva na seleção de EGM e este meio passou a ser denominado então de ágar mitis salivarius bacitracina (MSB). Apenas um pequeno número de enterococos e leveduras demonstraram crescimento nesse meio, em amostras de pacientes com lesões dentinárias avançadas ou amostras do dorso da língua; entretanto, as colônias de enterococos ou leveduras seriam facilmente diferenciadas dos EGM pela aparência da colônia.

2.4.1 Relação entre Cárie e EGM em Crianças Jovens

Os EGM não são detectados em bebês antes da erupção dentária, mas, ao irromper o primeiro dente, passam a colonizá-los. O sorotipo mais freqüente é o “c”, sendo isolado nos bebês e em suas mães (BERKOWITZ *et al.*, 1975). A aquisição inicial do EGM ocorre em média aos 26 meses de idade, num período designado como “janela de infectividade” (CAUFIELD *et al.*, 1993). Vários fatores contribuem para a colonização do EGM em crianças. A erupção dentária permite aumento da colonização pelo aumento do número de superfícies para aderência do microorganismo e esse aumento é proporcional à idade. A dieta infantil e hábitos de higiene oral também facilitam a colonização (WAN *et al.*, 2003). Em crianças na fase pré-dental, a freqüente exposição ao açúcar, especialmente lanches e chupetas adoçadas, estão correlacionadas com a contaminação por EGM (WAN *et al.*, 2001). Em bebês prematuros, este hábito é agravado pelo aumento do consumo de açúcar na dieta recomendado para incrementar a ingestão calórica (SAUVE; GEGGIE, 1991).

Crianças colonizadas por EGM até um ano de idade recebem influência do padrão de comportamento materno, principalmente no que se refere aos hábitos dietéticos. Essa contaminação precoce pode predispor a um aumento no risco de cárie na dentição decídua (GRINDEFJORD *et al.*, 1991). Crianças colonizadas por EGM aos 2 anos de idade parecem ser mais carieativas do que crianças colonizadas depois ou que não foram colonizadas por essas bactérias (ALALUUSUA; RENKONEN, 1983). Em crianças com cárie de primeira infância (CPI), a principal fonte de contaminação dessas crianças por EGM é a mãe (CAUFIELD *et al.*, 1993; ALALUUSUA *et al.*, 1996). A proporção de EGM no total de estreptococos é alta e a infecção por EGM com mais de um tipo clonal reflete alta freqüência de consumo de açúcar (ALALUUSUA *et al.*, 1996).

O número de EGM é o único fator microbiológico relacionado ao aparecimento de novas lesões de cárie, quando não existe no paciente lesão de mancha branca (KLOCK;

KRASSE, 1979). Nas superfícies sem cárie, a flora acidúrica representa apenas 2,5% da flora total, entretanto, nas superfícies cariadas, o percentual aumenta para 24,4- 27,5%. Os EGM representam em média de 40% (BOUE *et al.*, 1987) a 60% da flora total cultivável da placa bacteriana de lesões de cárie e margens de lesões de mancha branca e 10% da flora total cultivável da saliva (Van HOUTE *et al.*, 1982). Elevada concentração de EGM na saliva pode ser um indicador de alto risco em crianças bem jovens (CHOSACK *et al.*, 1988), no entanto para Wan *et al.* (2003), a colonização não é o fator mais importante no desenvolvimento da cárie, pois outros fatores, como consumo de açúcar e higiene oral, têm importante papel na determinação do risco à doença. A escovação regular é também importante para prevenir a contaminação por EGM em bebês (WAN *et al.*, 2003).

Apesar da combinação de infecção precoce por EGM e o uso inadequado de mamadeira ser um bom predictor, em certas populações, de CPI, estes não são os únicos fatores etiológicos dessa condição (TINANOFF; O'SULLIVAN, 1997). EGM pode ser difundido em população humana com extremamente baixa prevalência de cárie. Portanto, essas bactérias podem ser facilmente propagadas na população humana sem necessariamente estarem associadas à cárie, em razão do estilo de vida (CARLSSON *et al.*, 1987). O nível e a duração da infecção por EGM, entretanto, estão fortemente correlacionados com a incidência de cárie. A redução dos níveis de EGM pode ser obtida pelo uso de antimicrobianos em crianças altamente infectadas, prevenindo, assim, o aparecimento de lesões (ZICKERT *et al.*, 1983).

2.4.2 Cárie Precoce da Infância

Cárie em dentes decíduos de crianças pré-escolares é comumente referida como cárie precoce da infância (CPI) (SELWITZ *et al.*, 2007). É definida como a presença de 1 ou mais lesões (não cavitadas ou cavitadas), perdas dentárias por cárie ou superfícies dentárias restauradas em algum dente decíduo em crianças de idade inferior ou igual a 71 meses de idade ou menores. Em crianças abaixo de 3 anos de idade, qualquer sinal de cárie em superfície lisa é indicativo de CPI severa (S-CPI). De 3 a 5 anos de idade, 1 ou mais cavidade, perda dentária (por cárie) ou restauração em superfícies lisas nos dentes ântero-superiores ou ceo-s >4 (3 anos), >5 (4 anos) ou >6 (5 anos) constitui-se S-CPI (AAPD, 2008).

Em virtude da alta prevalência de cárie dental na Islândia, 158 pré-escolares foram examinados. No exame inicial, 45,8% das crianças estavam sem cárie. Um questionário de dieta revelou que o consumo de açúcar era acima de 30 momentos por semana, acima do qual a prevalência de cárie aumentava acentuadamente. Alguns desses açúcares eram consumidos na forma de medicamentos (antibióticos e anti-histamínicos). Amostras de salivas foram coletadas para determinar o número de EGM e lactobacilos, mostrando forte relação entre o número destes microorganismos e cárie (HOLBROOK *et al.*, 1989).

A prevalência de cárie e o número de EGM salivares em 356 crianças japonesas, com idade entre 0 e 2 anos foram determinados duas vezes num intervalo de um ano. Nenhum EGM foi isolado de crianças pré-dentadas. O número de EGM e a prevalência de cárie aumentaram com a idade. EGM foram isolados em 39% das crianças e sua concentração aumentou de acordo com o número de dentes erupcionados. As crianças que apresentaram contaminação por EGM no primeiro exame, mas não tinham cárie, mostraram alta prevalência de cárie no segundo exame, indicando que o estabelecimento precoce de EGM se encontra associado com o início de cárie na primeira infância (FUJIWARA *et al.*, 1991).

Em outro estudo, exame dental e coleta de saliva estimulada foram realizados em 37 crianças de 3 a 6 anos de idade, na favela do Vidigal, no Rio de Janeiro. Trinta e uma crianças eram carieativas e as superfícies oclusais foram as mais afetadas. Os resultados indicaram que os níveis de EGM e lactobacilos na saliva estavam significativamente relacionados à prevalência de cárie por superfície na dentição decídua (BRETZ *et al.*, 1992).

Procurando investigar a prevalência de componentes da microbiota oral em crianças que mamam que desenvolveram cáries rampantes, amostras de placa dental e saliva foram coletadas de 34 crianças que mamavam, entre 1 e 2,5 anos de idade, com (17) e sem cárie rampante (17) na Tanzânia. Nenhuma das crianças fazia uso de mamadeira ou tinha algum hábito de alimentação danoso. EGM e lactobacilos foram isolados da placa de todas as crianças com cárie rampante e da maioria das crianças sem cárie. *S. sobrinus* não foi encontrado. Os níveis de EGM na saliva foram diretamente relacionados à presença de cárie rampante. Os resultados mostraram que crianças que mamavam, de 1 a 2,5 anos de idade, mesmo sem cárie, estavam contaminados por EGM e lactobacilos e que cárie rampante pode ocorrer na ausência de mamadeira ou qualquer outro hábito alimentar danoso durante o desmame (MATEE *et al.*, 1992).

A relação entre cárie dental e número de EGM foi estudada em 2.728 crianças sul-africanas de 4 a 5 anos de idade, com ênfase nos fatores de confusão: ingestão regular de doces, higiene oral e presença de lactobacilos salivares. Baixos níveis de EGM foram encontrados em baixos níveis de cárie, mas altos níveis de EGM não foram encontrados em altos níveis de cárie. Com esse resultado os autores sugeriram uma reavaliação do papel dos EGM como fator de risco à cárie (GRANATH *et al.*, 1993).

Trezentas e sessenta e nove crianças de 3 a 4 anos de idade, inseridas em um programa governamental americano para famílias de baixa renda, foram avaliadas quanto à prevalência de cárie. Informações foram colhidas de seus pais quanto ao conhecimento sobre saúde oral, hábitos de higiene oral e alimentar, uso de antibióticos, dentre outras. A prevalência de cárie nos dentes ântero-superiores foi de 16%, sendo a superfície mesial dos incisivos centrais a mais afetada. Aproximadamente 90% dos pais das crianças que tinham cárie nos dentes ântero-superiores sabiam que permitir seu filho ir dormir com uma mamadeira era prejudicial para os dentes de seus filhos. Diferenças significativas nos níveis de EGM foram encontradas entre crianças com e sem cárie nos dentes ântero-superiores. Dessas crianças, 87% também tinham

cáries nos dentes posteriores, sugerindo que cárie em dentes anteriores pode contribuir para o aumento do risco de cárie em outros dentes (O'SULLIVAN; TINANOFF, 1993).

Um total de 462 crianças (negras, hispânicas e brancas), com idade média de 3,8 anos e baixo poder aquisitivo, foram examinadas para estudar a relação entre níveis de EGM e cárie dental. Oitenta e três por cento das crianças estavam contaminadas por EGM; entretanto, 39,1% das crianças negras tinham níveis mais elevados do que 28,4% das crianças brancas. Cáries de fossas e fissuras foram as mais prevalentes em crianças com níveis moderado e alto de EGM. Os resultados indicaram que diferenças entre negros, hispânicos e brancos podem influenciar a atividade de cárie dentro de populações que têm níveis semelhantes de EGM e mesmo padrão sócio-econômico (THIBODEAU *et al.*, 1993).

Em um levantamento epidemiológico de 3.000 crianças suecas de 18 meses de idade para avaliar a relação entre a prevalência de cárie e amamentação prolongada, 200 crianças foram selecionadas para um exame mais detalhado envolvendo a investigação sobre hábitos (dietéticos, higiene oral, sucção), uso de fluoretos e determinação dos níveis salivares de EGM e lactobacilos. As crianças foram divididas em 4 grupos quanto à presença ou não de cárie, e quanto à presença ou ausência de amamentação. Não houve diferença estatística nas crianças com cárie quanto à amamentação, no entanto, elas recebiam alimentação mais cariogênica do que as crianças sem cárie. EGM foi detectado em 67% das crianças e lactobacilos em 13%, essas crianças tinham significativamente mais cáries do que aquelas nas quais não foi possível detectar os microorganismos. Os resultados indicaram que crianças com hábito de amamentação prolongada teriam a tendência de estabelecer hábitos dietéticos deletérios, constituindo situações de risco para o desenvolvimento de cáries numa idade bem jovem (HALLONSTEN *et al.*, 1995).

Douglas *et al.* (1996), ao compararem a atual prevalência de cárie e níveis de EGM em crianças apaches com o encontrado 15 anos antes na mesma comunidade, observaram que não houve mudança quanto à prevalência de cárie, no entanto, o nível de tratamento realizado foi maior no grupo 15 anos depois. O índice ceo-d nesta população foi de 8,3 e o ceo-s foi de 19,2. As crianças que tinham cárie de mamadeira (64%) apresentavam maior severidade nas cáries de fissuras e maior prevalência nas cáries proximais do que as que não tinham cárie de mamadeira e expressavam níveis altos de contaminação por EGM. Esses resultados sugerem que cárie de mamadeira pode aumentar o risco de cáries em dentes posteriores.

Cento e quarenta e seis pré-escolares de baixa renda, com idade média de 3,8 anos de idade foram examinados quanto à prevalência de cárie e sua distribuição, bem como níveis salivares de EGM. Essas crianças foram examinadas anualmente durante 2 anos. As lesões de cárie foram categorizadas em: fissura, ântero-superior, proximal posterior e vestibulo-lingual. Níveis de EGM foram divididos em: baixo, moderado e alto. As observações nesse estudo sugeriram possível relação entre o nível de EGM e o padrão de cárie, bem como entre EGM e o índice de cárie (ceo-d ou ceo-s). Nessa população, crianças com baixos níveis de EGM, no início, ou não tiveram cárie ou tiveram um ceo-s baixo, quando comparada com crianças que

no início tinham contagem moderada ou alta (THIBODEAU; O'SULLIVAN, 1996). Oitenta e cinco dessas crianças foram acompanhadas por 6 anos. As que tinham sido classificadas como de alto risco à cárie no início apresentavam significativamente maior ceo-s para todos os dentes e para os 1^{os} molares do que as crianças classificadas como de moderado ou baixo risco à cárie em todas as idades. Crianças de alto risco à cárie aos 3 anos de idade expressaram maior ceo-s aos 8 anos de idade, contudo, o nível de cárie para todos os grupos de risco declinou após 8 anos de idade, em virtude da esfoliação dos dentes decíduos e concomitante perda de superfícies avaliadas. Os resultados do estudo sugerem que o uso de testes microbiológicos aos 3 anos de idade pode fornecer informações valiosas para identificar crianças de alto risco à cárie na dentição decídua e permanente, que são mais suscetíveis às cáries de fissuras, permitindo tratar mais agressivamente essas crianças, considerando o selamento oclusal como parte do tratamento preventivo dessas crianças (THIBODEAU; O'SULLIVAN, 1999).

Zoitopoulos *et al.* (1996) estudaram 641 crianças caucasianas e afrocaribenhas de 3 e 4 anos de idade, residentes em Londres, a fim de determinar a prevalência de cárie e microorganismos associados a cada grupo racial. Foram determinados os índices ceo-d e a contaminação por EGM, lactobacilos e fungos. O índice ceo-d foi menor e a contaminação por EGM e lactobacilos foi menos freqüente entre afrocaribenhos do que dentre caucasianos, mas em ambos os grupos os índices de contaminação se relacionaram significativamente à experiência de cárie.

A relação entre cárie, EGM, hipoplasia, dieta e hábitos de higiene oral foi investigada em 199 crianças americanas de 6 a 36 meses de idade. A prevalência de cárie foi alta: 46,8% apresentaram lesão de mancha branca, tendo-se observado cavitação em 39,1% das crianças estudadas. Crianças muito jovens já estavam contaminadas com EGM, sendo estas bactérias detectadas em 25% das crianças na fase pré-dental. Esses resultados sugerem que altos níveis de contaminação, hipoplasia e dieta cariogênica são fatores importantes na etiologia da cárie dental nessa população. Contudo, dormir com uma mamadeira, lanches freqüentes e compartilhar utensílios com a mãe não foram significantes preditores de risco de cárie (MILGROM *et al.*, 2000).

Na tentativa de estimar a prevalência de cárie e relacioná-la a fatores preditores de risco, Petti *et al.* (2000) examinaram 1.494 crianças italianas de 3 a 5 anos de idade, quanto a contagens de EGM, variáveis comportamentais e sócio-econômicas, dieta e estado nutricional. Os autores verificaram que o percentual de crianças tendo pelo menos um dente afetado por cárie foi 27,3%, tendo pelo menos dois incisivos superiores afetados foi 7,6%. O índice ceo-d foi 1,1 e o número médio de dentes com cárie foi 0,9. Crianças com pelo menos dois incisivos superiores afetados tinham 56% dos dentes cariados. Classe social baixa ou média, uso de mamadeira com bebidas adoçadas, altos níveis salivares de EGM e desnutrição encontravam-se diretamente associados a pelo menos dois incisivos superiores afetados, enquanto consumo de leite e iogurte e pequena quantidade de placa dental foram inversamente associados a este quadro clínico.

Níveis salivares de EGM e a prevalência de cárie dental foram avaliados em 142 crianças, de 12 a 31 meses de idade, no Município de Piracicaba-SP. Durante o exame clínico, foram diagnosticadas lesões de manchas brancas e cavitações de todas as superfícies dentárias. EGM foram detectados em 80,3% das crianças estudadas, sendo que 21,8% destas apresentaram altos níveis salivares desses microorganismos. Os níveis salivares de EGM foram dependentes do número de dentes irrompidos na cavidade bucal. Observou-se associação positiva entre os níveis salivares desses microorganismos e o número de crianças com cárie dental. Além disso, observou-se correlação positiva entre os níveis de EGM na saliva e o número de lesões diagnosticadas, sendo maior o coeficiente de correlação quando as lesões iniciais foram consideradas (MATTOS-GRANER *et al.*, 1998). Quando os autores associaram prevalência de cárie, análises microbiológicas e variáveis na dieta, observaram o fato de que crianças que nunca mamaram ou só mamaram até 3 meses, exibiram maior prevalência de cáries do que as que mamaram por um período maior. Maior prevalência de cárie foi também observada entre crianças que usaram mamadeira contendo leite com açúcar e cereal do que crianças que usaram mamadeira com leite com ou sem açúcar. Crianças que iniciaram alimentação salgada aos 7 meses ou após, mostraram maior prevalência de cárie do que as que iniciaram mais cedo. Esses dados suportam a evidência de uma associação entre prevalência de cárie, níveis de EGM e fatores da dieta em crianças jovens (MATTOS-GRANER *et al.*, 1998a). Os autores reportaram o acompanhamento dessas crianças após um ano. Eles observaram que, apesar da infecção precoce por EGM e grande consumo de açúcar, EGM podem atingir níveis relativamente estáveis após 2 anos de idade (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001).

Três grupos de 20 crianças sem cárie (SC), cárie de fissura (CF) e cárie de mamadeira (CM), de 18 a 48 meses de idade, foram estudadas em Piracicaba-SP. O índice ceo-s e frequência de consumo de açúcar foram avaliados. EGM, componentes inorgânicos (F, Ca e P) e polissacarídeos insolúveis foram quantificados na placa dental. Nos três grupos o consumo de açúcar foi estatisticamente diferente. Componentes inorgânicos e polissacarídeos insolúveis estavam mais baixos na placa de crianças com CM do que em SC. Polissacarídeos insolúveis, consumo de açúcar e ceo-s foram correlacionados significativamente com CM e CF; o mesmo foi visto para EGM e ceo-s de CM. Assim, crianças com CM e CF tiveram baixas concentrações de componentes inorgânicos, altas concentrações de polissacarídeos insolúveis e de EGM, e alta frequência de exposição ao açúcar. Os resultados apresentados deram suporte ao conceito de que dieta rica em açúcar muda a composição bioquímica e microbiológica da placa dental, explicando a ocorrência de padrões diferentes de cárie na dentição decídua (NOBRE DOS SANTOS *et al.*, 2002).

Tendo como meta caracterizar e comparar fatores demográficos, comportamentais e ambientais associados à CPI, e analisar níveis salivares de EGM e lactobacilos em população com predominância hispânica, 146 crianças de 3 a 55 meses de idade com grande experiência de cárie foram examinadas. CPI foi inicialmente associada com a presença de EGM e carência

de acesso à assistência dental. Níveis salivares de EGM entre crianças jovens foram mais elevados que o esperado em uma população com saúde bucal. Foi demonstrada forte associação entre níveis bacterianos relativamente baixos e cárie em bebês e crianças. Uso de antibiótico, exposição ao chumbo e anemia não foram significativamente associados com o número de dentes ou superfícies cariadas ou restauradas. CPI correlacionou-se significativamente com a idade das crianças e dificuldade de acesso ao atendimento bucal, bem como com a renda familiar e baixo nível educacional materno (RAMOS- GÓMEZ *et al.*, 2002).

Para determinar a relação entre os fatores relacionados à CPI com níveis salivares de EGM, 95 crianças com CPI, oriundas de famílias de baixa renda da zona rural de Ankara (Turquia), participaram desse estudo. Hábito de amamentação ou uso de mamadeira persistiu em 31,5% das crianças após os 37 meses de idade; 40% usaram mamadeira, 35,5% mamaram e 29,4% ambos. A prevalência de cárie foi significativamente relacionada à idade e ao hábito alimentar. 81% das crianças não escovavam os dentes e 41% fizeram uso de remédios adoçados. As altas contagens de EGM foram determinadas com o aumento da idade, o uso de mamadeira e o hábito de “beliscar” (ÖLMEZ *et al.*, 2003).

Em uma revisão sistemática sobre fatores de risco à cárie dental em crianças jovens, observou-se que: uma escovação mais efetiva realizada pelos pais seria mais significativa do que várias escovações ao dia, principalmente quando associada ao uso de dentifrício fluoretado. Apesar da quantidade, frequência e tempo de consumo de açúcar serem importantes, em crianças que escovavam seus dentes 2 vezes ou mais ao dia, o consumo de açúcar não pareceu estar relacionado às cáries. A idade com que as crianças se contaminaram com EGM foi um significativo indicador do risco de cárie, mas não foi o fator decisivo ao aparecimento da doença. O nível de educação materna foi também importante no aparecimento da doença e hipoplasia de esmalte foi igualmente um fator predisponente. Logo, a cárie pode ser controlada no balanço entre bons e maus hábitos (HARRIS *et al.*, 2004).

Com o propósito de determinar a prevalência de CPI em crianças de 3 a 5 anos de idade na população da 1ª nação no Canadá, para desenvolver estratégias de promoção de saúde dental, 87 crianças foram examinadas em estudo reportado por Peressini *et al.* (2004). Considerou-se CPI como cárie ou restauração em dois ou mais dentes ântero-superiores ou com $ceo-d \geq 4$. Setenta e quatro por cento das crianças apresentavam cárie, sendo que 52% tinham CPI. Os meninos tiveram mais cáries e CPI que as meninas.

Severidade da CPI (S-CPI) e sua relação com fatores sócio-econômicos e comportamentais foram avaliadas em 520 crianças de 6 a 19 meses de idade da zona rural da Tailândia. A severidade da CPI foi estimada usando a proporção de dentes com CPI por dente erupcionado. Exames clínicos e microbiológicos foram realizados nas crianças e nas mães/cuidadoras e um questionário sobre as crianças foi respondido. Entre 15-19 meses de idade, a prevalência de cárie foi 82,8% (40,8% cavitadas e 42% não cavitadas) com uma média de $ceo-d$ de 4,18 e a S-CPI foi de 0,45. Crianças provenientes de família de baixa renda, com mães/

cuidadoras com pouca educação, com dentes cariados, tiveram elevada S-CPI, bem como as crianças que mamavam ou tinham altas contagens de EGM. Os resultados revelaram que só o nível salivar de EGM foi estatisticamente um significativo predictor de CPI nessas crianças (VACHIRAROJPISAN *et al.*, 2004).

Relacionar microorganismos salivares (EGM, lactobacilos e fungos) e CPI em associação com fatores sócio-econômicos, características maternas e hábitos alimentares foi objetivo de um estudo que envolveu 101 crianças turcas de 15 a 35 meses de idade. Os resultados revelaram que o CPO-S da mãe foi um fator de impacto para a experiência de cárie nas crianças. O uso prolongado de mamadeira com leite adoçado, uso de chupetas e o partilhamento de utensílios e comida com a mãe encontraram-se fortemente associados com a colonização de EGM, lactobacilos e fungo, respectivamente. Uma significativa correlação entre educação materna e EGM foi também verificada (ERSIN *et al.*, 2006).

Hallett e O'Rourke (2006) investigaram associação das variáveis sociais, comportamentais e o padrão e severidade da CPI em estudo transversal com 2.515 crianças, com idade entre 4 e 5 anos. Foram utilizados os índices ceo-d e ceo-s e um questionário sobre condições sociais e demográficas, nascimento, alimentação infantil, hábitos de saúde geral e oral para a realização do estudo. Crianças com cárie (847) foram divididas em padrão anterior (12,3%) e posterior de cárie (21,4%) e por severidade (S-CPI ceo \geq 6 (9,4%) e não S-CPI ceo < 6 (24,3%)). Os índices ceo-d e ceo-s médio foram $1,4 \pm 2,77$ e $2,28 \pm 6$, respectivamente. Crianças de famílias de baixa renda que dormiam com uma mamadeira ou que usaram frequentemente mamadeira durante o dia, com nível educacional materno baixo tiveram alta prevalência de S-CPI. Dois hábitos bucais foram associados com S-CPI: escovação não supervisionada e excesso de creme dental. Outras origens étnicas que não a caucasiana também foram determinante para a S-CPI.

2.5 Cárie e Hipoplasia de Esmalte

Um grupo de 184 aborígenes australianos pré-escolares foi estudado quanto à prevalência de cárie e hipoplasia de esmalte. Os resultados mostraram que 98% das crianças tiveram pelo menos um dente com defeito de esmalte e 78% apresentaram cárie dental. O alto nível de defeito do esmalte, agravado por pouca exposição ao flúor, pobre higiene oral e dieta rica em açúcares refinados pode ser um importante fator de risco à cárie nesse grupo de crianças (SEOW *et al.*, 1996).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este estudo visou a estudar a saliva de crianças desnutridas, determinando seu perfil protéico e níveis de EGM, comparando três grupos de crianças sistematicamente desnutridas, com idades de 12 a 71 meses, livres de cárie ou portadoras de CPI, comparando estes grupos com um grupo de crianças nutridas.

3.2 Objetivos Específicos

Investigar se:

1. crianças com diferentes graus de desnutrição possuem maior ou menor experiência de cárie do que crianças nutridas;
2. crianças com diferentes graus de desnutrição encontram-se mais ou menos contaminadas por EGM do que crianças nutridas;
3. o perfil protéico salivar de crianças desnutridas se diferencia do perfil protéico salivar observado entre crianças nutridas; e
4. há correlação entre experiência de cárie, contaminação por EGM, perfil protéico salivar e graus de desnutrição.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do Estudo

O estudo realizado foi observacional, transversal e analítico.

4.2 Amostra

Este estudo foi desenvolvido no Município de Fortaleza, no Instituto de Prevenção à Desnutrição e Excepcionalidade (IPREDE), centro de referência no tratamento da desnutrição no Estado do Ceará. Um total de 120 (cento e vinte) crianças voluntárias com desnutrição leve (I), moderada (II) e grave (III), segundo o padrão da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2006), sendo 45 (quarenta e cinco) com cárie e 75 (setenta e cinco) sem cárie, de ambos os sexos, com idades de 12 a 71 meses, foi selecionado para participar do estudo. Quarenta e sete crianças nutridas, atendidas na Clínica de Odontopediatria da Universidade Federal do Ceará, de ambos os sexos, na mesma faixa etária, com cárie (25 crianças) e sem cárie (22 crianças), compuseram o grupo-controle.

4.3 Seleção da Amostra

4.3.1 Critérios de Inclusão

Os voluntários que participaram do estudo tiveram os seguintes critérios de inclusão:

- crianças de ambos os sexos;
- sadias (com ausência de doenças sistêmicas, hereditárias ou congênitas);
- nutridas ou desnutridas (desnutrição graus I, II e III segundo a OMS);
- com idade situada na faixa de 12 a 71 meses;
- devidamente cadastrados no **IPREDE**;
- livres de cárie (ausência de lesões cariosas clinicamente detectada); e
- portadores de CPI (presenças de lesões cariosas clinicamente detectadas).

4.3.2 Critérios de Exclusão

Adotaram-se, para os voluntários que participaram do estudo, os seguintes critérios de exclusão:

- crianças com doenças sistêmicas, hereditárias ou congênitas, identificadas durante o momento da anamnese;
- as que estavam tomando medicamentos, além dos suplementos vitamínicos rotineiramente prescritos no tratamento da desnutrição; e
- aquelas cujos pais ou responsáveis legais se recusaram a assinar o termo de consentimento livre esclarecido.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (ANEXO A, B). Os pais das crianças assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A) para participação das crianças no estudo.

4.4 Coleta de Dados

4.4.1 Anamnese

Os voluntários foram submetidos a uma anamnese para obtenção de informações concernentes ao seu estado geral de saúde, por meio do preenchimento de ficha específica (APÊNDICE B)

4.4.2 Exame Bucal

O exame das crianças desnutridas foi realizado pela pesquisadora no consultório odontológico pertencente à Instituição, sob luz artificial (refletor odontológico), utilizando espelho bucal plano nº 5, sonda exploradora e seringa tríplice. O exame dental das crianças nutridas foi realizado sob as mesmas condições na Clínica de Odontopediatria da Universidade Federal do Ceará.

Durante o procedimento de exame dos dentes, os seguintes parâmetros foram averiguados e anotados na ficha dentária (APÊNDICE C):

1. situação dos tecidos moles intraorais;
2. identificação de todos os dentes - decíduos e permanentes. O dente foi considerado erupcionado se alguma parte da coroa foi clinicamente visualizada;

3. identificação dentes decíduos, já com mobilidade fisiológica;
4. identificação de todas as superfícies
 - cariadas (cavitadas e não cavitadas);
 - restauradas;
 - extraídas em razão de cárie; e
 - com hipoplasia de esmalte.

4.4.3 Coleta de Saliva

Após a realização do exame dentário, duas amostras de saliva foram coletadas para cada participante entre 8 e 11 horas da manhã, para reduzir possíveis contribuições circadianas, após um mínimo de uma hora de jejum. Os procedimentos rotineiros de higienização da cavidade oral tinham sido realizados pelo menos uma hora antes da coleta. A primeira amostra foi de saliva não estimulada, ou seja, a criança permaneceu em repouso na perna da mãe por um período de 30 minutos e, logo após, a saliva foi coletada fazendo-se uso de uma pipeta plástica. A segunda amostra foi coletada com estímulo. A criança mascou um pedaço de parafina Parafilm® M laboratory film (American National Can, Greenwich, CT) presa a um pedaço longo de fio dental para evitar a deglutição do material. A mastigação do pedaço de parafina teve por objetivo liberar os microorganismos da superfície dentária (JORDAN *et al.*, 1987). Após um período de 60 segundos, o Parafilm® M laboratory film (American National Can, Greenwich, CT) foi removido da boca e descartado, e a saliva coletada durante o primeiro minuto foi acondicionada em tubos *ependorfs* para posterior análise.

4.5 Transporte e Armazenagem dos Espécimes

As amostras de saliva foram transportadas do IPREDE até a Universidade Federal do Ceará (UFC) sob gelo. A amostra de saliva não estimulada foi utilizada para análise protéica, tendo sido centrifugada (centrífuga JANETZKI) a 3000 rpm durante 5 minutos a 32°C, sendo retirada de 100 a 200 µL do sobrenadante, que foi liofilizado e armazenado a -20°C para posterior análise.

A amostra de saliva estimulada foi utilizada para análise microbiológica, tendo sido processada no mesmo dia no Laboratório de Anaeróbios do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFC, até no máximo 2 horas após a coleta (RUOFF *et al.*, 2003).

4.6 Análise Microbiológica

O meio de cultura utilizado para a contagem de estreptococos *mutans* (EGM) foi o ágar mitis salivarius bacitracina (MSB) (Difco Detroit, Michigan, USA). Esse meio é seletivo para EGM, porque a presença de telurito de potássio e bacitracina em concentrações críticas não é tolerada por outros estreptococos do grupo *Viridans* (GOLD *et al.*, 1973). Para o preparo do meio, foram necessárias algumas soluções, conforme segue.

1. Telurito de Potássio

Uma solução de telurito de potássio a 1% foi preparada pela adição de 0,1 g de telurito de potássio (VETEC Química Fina LTDA, Rio de Janeiro) em 10 mL de água destilada. Os componentes foram misturados, filtrados com filtro de papel minisart 0,2µm (Santorius) e armazenados em um frasco escuro no refrigerador a 4° C.

2. Bacitracina

Uma solução de bacitracina a 1% foi preparada pela adição de 0,1 g de bacitracina (Sigma) a 10 mL de água destilada. Os componentes foram misturados, filtrados com filtro de papel minisart 0,2µm (Santorius) e armazenados em um frasco escuro no refrigerador a 4° C.

3. Preparo do Meio

Para 100 mL de meio MSB reconstituído, foram adicionados 15g de sacarose, 9g de meio base ágar mitis salivarius (MAS) e 100 mL de água destilada. Após a sacarose e o MAS serem devidamente misturados com água destilada no tubo de Erlenmeyer, esse foi colocado na autoclave a 121° C por 15 minutos. Após o tubo de Erlenmeyer ser retirado da autoclave, esperou-se a temperatura baixar até aproximadamente 45° C e acrescentou-se 1 mL da solução de telurito de potássio e 1 mL da solução de bacitracina. Com emprego de pipetas estéreis, colocou-se 10 mL de meio em cada placa, cuja composição foi conforme segue: 10mL de água destilada; 0,9g de meio base ágar mitis salivarius (MAS); 1,5g de sacarose; 0,1mL de bacitracina e 0,1mL de telurito de potássio.

4. Preparo da Solução Salina

Para o preparo da solução salina a 0,9%, foram necessários 0,9g de cloreto de sódio e 100mL de água destilada. Após a homogeneização dos componentes, a solução foi levada à autoclave a 121° C por 15 minutos. Em cada tubo de hemólise foram colocados 0,9 mL de solução salina estéril.

4.6.1 Diluição da Saliva Estimulada, Semeadura e Incubação

Um volume correspondente a 0,1 mL de cada amostra de saliva estimulada foi assepticamente transferido com o auxílio de pipeta para um tubo de hemólise contendo 0,9 mL de solução salina estéril. A mistura de saliva e solução salina foi então homogeneizada. Após essa diluição, a saliva passou por mais duas diluições, sendo usadas nesse estudo as diluições de 1:100 e 1:1000. Um volume de 0,1 mL de cada diluição utilizada foi cultivado em duplicatas no meio MSB. As placas de Petri semeadas foram incubadas em estufa a 37 °C em ambiente de microaerofilia (jarra com vela) por 48 horas. As unidades formadoras de colônias foram contadas para cada placa de Petri pela sua morfologia (WESTERGREN; KRASSE, 1978).

4.6.2 Contagem das Colônias

A contagem das colônias foi feita por observação visual direta das placas de Petri. Os dados foram convertidos em ufc/mL de saliva, multiplicando-se o número de colônias encontradas pela recíproca diluição.

4.6.3 Aplicação de Testes Bioquímicos

A série bioquímica para caracterização de espécies de EGM utilizou o meio tioglicolato de sódio suplementado por carboidratos (manitol) para fermentação, e ágar esculina para hidrólise (RUOFF *et al.*, 2003). Foi removida uma ufc de bactéria com agulha flambada e introduzida num tubo de hemólise contendo manitol sólido. Outra ufc foi retirada do meio e acondicionada em tubo de hemólise contendo esculina sólida. Os tubos de hemólise foram postos em estufa a 37° C. Após 72 horas, foi realizada a leitura da prova bioquímica, sendo considerado EGM (positivo) quando houve a mudança de cor vermelha para amarela (fermentação do manitol) e de âmbar para preto (hidrólise da esculina). Quando os dois testes foram positivos, considerou-se que houve crescimento de EGM.

4.7 Análise das Proteínas Salivares

4.7.1 Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford

A concentração de proteínas totais salivares (CPT) das alíquotas de saliva foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando uma curva de albumina sérica bovina

(BSA) (0,5 a 5 mg/mL) como padrão. As amostras de saliva liofilizadas foram reconstituídas com 50 μ L de água milliQ, sendo homogeneizadas com uso de um agitador mecânico (AP 56 PHOENIX). Foram adicionados 2,5 mL de solução de Bradford a 10 μ L da amostra reconstituída. Em seguida, a solução foi homogeneizada e após 10 minutos, foram feitas as medidas da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro Ultraspec 1100 (Pharmacia, England). Os resultados foram expressos em miligrama de proteína por mililitro de saliva (mgP/mL), calculados com base na curva-padrão com BSA.

4.7.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e β -mercaptoetanol

A avaliação do perfil protéico das amostras de saliva foi realizada utilizando-se eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida, segundo a técnica descrita por Laemmli (1970), adaptada para géis (0,1 cm de espessura) de separação em placas (10 x 10 cm). O gel de aplicação foi preparado em solução-tampão Tris-HCl 25 mM, pH 6,8 e SDS 1 %. O gel de separação continha 12,5 % de poliacrilamida preparado em tampão tris-HCl 3 M pH 8,8 em presença de SDS 1% .

As amostras de saliva, 20 a 35 μ gP/poço, foram solubilizadas em tampão Tris-HCl pH 8,3, contendo SDS 1% e azul de bromofenol 0,02 %, acrescidas de β -mercaptoetanol na concentração de 1%, e incubadas a 100 °C por 5 minutos em banho-maria. Além das amostras de saliva, em todos os géis foi aplicada uma mistura de proteínas com massas moleculares conhecidas (AMRESCO), a saber: miosina (212 kDa), B-galactosidase (116 kDa), fosfolisase B (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), Inibidor de tripsina de soja (21,4/19,7 kDa) e Lisozima (14,4 kDa).

A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 100 V e amperagem iniciando em 25 mA, usando fonte BUCHLER (USA). O tampão de corrida utilizado foi tris-HCl 0,025M/glicina 0,192 M, contendo SDS 0,1 % pH 8,8. Após a corrida, o gel de separação foi fixado em solução de TCA a 10 % por 1 h e em seguida foi corado *overnight* com solução de comassie R-250 0,05 % preparada em solução de metanol/ácido acético/água na proporção de 1:3:5 (v/v/v). O gel foi descorado em solução de metanol/ácido acético/água na proporção, de 1:3:5 (v/v/v).

Os géis descorados foram digitalizados em Scanner *Amersham Biosciences* e, em seguida, analisados utilizando-se o programa Image Quant TL (Amersham Biosciences Corp., San Francisco, USA). As massas moleculares das bandas protéicas encontradas nas amostras de saliva foram determinadas a partir da curva-padrão obtida com as proteínas de massas moleculares conhecidas.

4.8 Análise Estatística

O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para verificar se havia diferenças na idade, ceo-s, contagens de EGM e CPT entre as crianças nutridas e desnutridas, bem como para a comparação dessas variáveis entre crianças sem experiência de cárie e aquelas com e sem severidade da cárie de primeira infância. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparação da idade, ceo-s, contagens de EGM e CPT entre os sexos e entre os grupos GI e GII, GN e GI/GII, GIII e GI/GII, GN e GIII. Para comparações de gêneros entre crianças sem experiência de cárie e aquelas com e sem severidade da cárie de primeira infância, foi usado o Teste do Qui-quadrado. Para verificar a correlação de monotonicidade entre as diferentes variáveis o coeficiente de correlação de Spearman foi aplicado. Em virtude da variável contagem de EGM possuir grande assimetria, com razoável número de observações extremas, dificultando a verificação de sua influência na explicação da experiência de cárie, utilizou-se o logaritmo da contagem de EGM. As diferenças só foram consideradas como estatisticamente significantes quando o p-valor < 0,05.

5 RESULTADOS

Cento e vinte e uma crianças desnutridas foram examinadas e tiveram sua saliva coletada para as duas análises (microbiológica e bioquímica), no entanto percebeu-se que uma criança foi examinada e teve sua saliva coletada duas vezes, o seu segundo exame bem como suas coletas de saliva foram desprezadas. Para a análise microbiológica, 120 crianças participaram, no entanto, apenas 119 crianças participaram da análise bioquímica em virtude de uma amostra ter-se perdido durante a liofilização. Essa amostra pertencia a GI. Quarenta e sete crianças saudáveis participaram como grupo-controle.

5.1 Graus de desnutrição

Foram avaliadas crianças pertencentes aos três graus de desnutrição, segundo a OMS: I ou leve (GI), II ou moderado (GII) e III ou grave (GIII).

Trinta e uma crianças pertenciam ao GI, sendo 14 meninos e 17 meninas, 16 crianças sem cárie e 15 crianças com cárie; no GII foram examinadas 59 crianças, sendo 22 meninos e 37 meninas, 38 crianças sem cárie e 21 crianças com cárie; e no GIII foram estudadas 30 crianças, sendo 19 meninos e 11 meninas, 21 crianças sem cárie e 9 crianças com cárie (Tabela 1).

5.2 Sexo

Não houve diferença significativa nos percentuais dos sexos em nenhum grau de desnutrição nem entre os saudáveis (Teste Exato de Fischer) (Tabela 2), bem como não houve diferença significativa, quanto ao sexo, nas variáveis: ceo-s, contagens de EGM e CPT, porém quanto à idade, os meninos do GIII são mais jovens do que as meninas ($p=0,0028$) (Teste de Mann-Whitney) (Tabela 3).

5.3 Idade

A idade das crianças nos diferentes graus de desnutrição com experiência de cárie foi maior do que nas crianças sem experiência de cárie, GI ($p=0,0071$), GII ($p=0,0000$) e GIII ($p=0,0030$); não houve diferença significativa entre as crianças saudáveis, com e sem experiência de cárie ($p=0,1754$) (Tabela 4). Comparando as idades das crianças desnutridas com experiência de cárie, observou-se que as crianças GI ($p=0,0066$) e as crianças GIII ($p=0,0560$) possuem idades significativamente menores do que as crianças GII, não havendo diferença significativa entre GI e GIII ($p=0,7860$) (Tabela 5).

5.4 Experiência de Cárie

Das 120 crianças desnutridas examinadas (idade média 41 meses), 75 não apresentaram lesão de cárie (62,5%) (Tabela 1). Dentre aquelas com cárie, 45 (37,5%) foram categorizadas como tendo cárie somente em dentes anteriores, apenas em dentes posteriores ou ambos, para cada grau de desnutrição. Sete crianças (15,55%) só apresentaram cáries em dentes anteriores, cáries em dentes posteriores foram encontradas em 22 crianças (48,89%) e em 16 crianças (35,56%) tanto nos dentes anteriores como nos posteriores. Sete (15,55%) crianças apresentaram manchas brancas, sendo que apenas 3 crianças (6,67%), uma em cada grau de desnutrição, só apresentaram manchas brancas. As que só apresentaram lesão em dentes anteriores tiveram 2 ou mais lesões de cárie. Nas crianças que só apresentaram lesão em dentes posteriores, 5 só tiveram o primeiro molar comprometido, 12 só tiveram o segundo molar e 5 tiveram comprometimento dos dois molares (Tabela 6). A criança que manifestou a doença mais cedo tinha 15 meses de idade, 12 dentes presentes (8 incisivos e 4 primeiros molares) e grau de desnutrição III.

Das 47 crianças saudáveis examinadas (idade média 61 meses), 22 não apresentaram lesão de cárie (46,8%) e 25 apresentavam lesões de cárie (53,2%) (Tabela 7). Três só apresentaram cárie em dentes anteriores (12%), 14 exibiram cárie em dentes posteriores (56%) e 8 em dentes anteriores e posteriores concomitantemente (32%) (Tabela 8). Seis crianças apresentaram lesão de mancha branca (24%), sendo que 2 só mostraram lesão de mancha branca (8%), não exibindo cavitação. As lesões de mancha branca se localizaram nos dentes caninos. Nas crianças que tiveram cárie apenas nos dentes posteriores, 4 só apresentaram lesão no 1º molar, 5 no 2º molar e 5 tiveram cárie nos dois molares (Tabela 8). O dente mais afetado foi o 2º molar inferior (22 dentes), seguido pelo 1º molar inferior (20 dentes). No arco superior, 1ºs e 2ºs molares foram igualmente afetados (14 dentes), enquanto, incisivos centrais superiores foram os dentes anteriores mais afetados (11 dentes), seguido dos caninos superiores (7 dentes) e incisivos laterais (5 dentes). Os incisivos centrais inferiores não apresentaram lesões, mas os incisivos laterais inferiores apresentaram 1 lesão e os caninos inferiores 3 lesões.

De acordo com o índice de cárie proposto pela AAPD (2008), o ceo-d e o ceo-s variaram de 0-20 e 0-72, respectivamente (Tabela 9). Os índices ceo-d e ceo-s médios foram, respectivamente, 1,65 e 2,47. O índice ceo-s médio foi de 2,38 para o GI; 1,93 para o GII e 3,63 para o GIII.

Cento e noventa e nove dentes estavam cariados, sendo 106 dentes superiores (53,26%) e 93 inferiores (46,73%). O mais afetado foi o 2º molar inferior (50 dentes), seguido pelo 1º molar inferior (36) e do 2º molar superior (36). O molar menos acometido foi o 1º molar superior (20). No segmento ântero-superior, o incisivo central apresentou mais dentes comprometidos (28) que o incisivo lateral (14) e o canino (8). Apenas 7 dentes ântero-inferiores estavam cariados (Tabela 10).

Duzentas e noventa e sete superfícies dentárias apresentaram a doença cárie. Na Tabela 11 pode ser vista a distribuição por dente e por idade. Os 1^{os} molares inferiores tiveram maior número de superfícies cariadas (68) do que os 2^{os} molares inferiores (66 superfícies), no entanto os 2^{os} molares superiores (50 superfícies) tiveram mais faces afetadas do que os 1^{os} molares superiores (33). Dos dentes ântero-superiores, os incisivos centrais foram os mais afetados (40 superfícies), seguidos dos incisivos laterais (24 superfícies) e dos caninos (8 superfícies). Só 4 pacientes apresentaram lesões nos dentes ântero-inferiores, onde um só paciente foi responsável por 84,62% das lesões nessa região.

Segundo o critério da OMS, apenas 42 crianças desnutridas tinham a doença presente. Os índices ceo-d e ceo-s também variaram de 0-20 e 0-72 respectivamente (Tabela 15). O índice ceo-d e ceo-s médio foram, no entanto, respectivamente, 1,54 e 2,35. Cento e oitenta e cinco dentes e 283 faces estavam acometidos pela doença, e o componente cariado (B) foi o mais prevalente (164 dentes e 214 faces), seguido pelo componente extraído (E) (11 dentes e 51 faces) e o obturado (D) (10 dentes e 18 faces).

A experiência de cárie nas crianças estudadas aumentou com a idade ($p=0,0000$) (Correlação de Monotonicidade de Spearman) (Tabela 12), não havendo diferença significativa nem entre os diferentes graus de desnutrição ($p=0,5256$) (Teste de Kruskal-Wallis) (Tabela 13) nem entre estes e os saudáveis quanto ao ceo-s ($p=0,6094$) (Teste de Kruskal-Wallis) (Tabela 14). Uma associação diferencial entre ceo-s e idade não foi observada após uma análise combinada destas duas variáveis entre crianças saudáveis e desnutridas.

Quanto à severidade da cárie precoce da infância (S-CPI) (Tabela 16), não foi encontrada relação significativa entre as variáveis sexo e S-CPI ($p=0,6677$) (Teste Qui-Quadrado) (Tabela 17) nem entre os diferentes graus de desnutrição, quando se consideram apenas as crianças desnutridas com cárie ($p=0,2845$) (Teste Qui-Quadrado) (Tabela 18). Houve diferença significativa na idade das crianças sem cárie e das crianças com cárie, seja na presença ou ausência de S-CPI ($p=0,0000$) (Teste de Mann-Whitney) (Tabela 19), onde S-CPI foi mais freqüente entre crianças mais velhas. Assim, a experiência de cárie aumentou com a severidade da doença, mas este achado independe do estado nutricional das crianças, não se relacionando com o aumento da severidade da desnutrição.

Utilizando-se o modelo logístico para variáveis binárias, em relação à experiência de cárie, com as variáveis explicativas – grau de desnutrição, sexo, idade, contagem de EGM e CPT, sendo estado nutricional e sexo variáveis categóricas – observou-se que as variáveis sexo ($p=0,7094$) e CPT ($p=0,2720$) não apresentaram contribuição estatisticamente significativa para a experiência de cárie; enquanto as variáveis grau de desnutrição ($p=0,0316$), idade ($p=0,0000$) e logaritmo da contagem de EGM ($p=0,0321$) apresentaram contribuição positiva para a experiência de cárie. Dessa forma, tanto o aumento da idade quanto o logaritmo da contagem de EGM aumentam o risco à cárie. Em relação ao grau de desnutrição, observou-se que, em relação aos saudáveis, houve maior

risco à cárie para as crianças desnutridas GI ($p=0,0042$) e GIII ($p=0,0372$); entretanto, o mesmo não foi observado no GII ($p=0,1578$) (Tabela 20).

5.5 Contaminação por EGM

EGM estava presente na saliva da maioria das crianças desnutridas (69 crianças; 57,5%), mesmo das que não apresentavam lesão de cárie (49,3%) e em idade bem tenra (12 meses). Apenas uma criança (17 meses) do estudo se encontrava em fase pré-dental, nela não sendo detectada a presença do EGM.

Os níveis salivares de EGM encontrados nas crianças desnutridas variaram de não detectáveis a $8,24 \times 10^6$ ufc/mL e conforme vemos nas Tabelas 21, 22 e 23, foram agrupados em três categorias de contagens: 0, 1 a $< 10^5$ e $\geq 10^5$. Das crianças contaminadas, 43,48% (30 crianças) apresentaram contaminação moderada (até 10^4) e 56,52% (39 crianças) apresentaram altos níveis de contaminação ($\geq 10^5$), pois quantidades acima de 10^5 - 10^6 ufc/mL são consideradas altos níveis de infecção por EGM, sendo indicativas de alto risco à cárie (JORDAN *et al.*, 1987). O percentual de crianças saudáveis contaminadas por EGM foi de 65,96% (31 crianças), sendo que 61,29% (19 crianças) encontravam-se moderadamente e 38,71% (12 crianças) altamente contaminadas.

As categorias de contagens foram relacionadas com o grau de desnutrição, o sexo, o ceo-s e a idade. Não houve diferença de contagem de EGM quando comparados os graus de desnutrição entre si ($p=0,5352$) (Tabela 13) nem entre os saudáveis ($p=0,5406$) (Tabela 14). Comparando crianças sem CPI e crianças com presença ou ausência de S-CPI, houve diferença em relação à contagem de EGM ($p=0,0002$) (Tabela 19); no entanto, comparando apenas crianças com CPI, não houve diferença significativa na contagem de EGM quanto a S-CPI ($p=0,9749$) (Tabela 24); esse aumento da severidade foi independente do estado nutricional das crianças. A contagem de EGM, entretanto, cresceu com o aumento da idade das crianças ($p=0,0308$) e com o aumento do ceo-s ($p=0,0003$) (Correlação de Monotonicidade de Spearman) (Tabela 12).

Ao comparar o logaritmo da contagem de EGM das crianças com (ceo-s>0) e sem (ceo-s=0) experiência de cárie, observou-se diferença nos graus de desnutrição GII ($p=0,0078$) e GIII ($p=0,0617$), pois as crianças com experiência de cárie (ceo-s>0) apresentaram mais EGM na saliva. Não houve, porém, diferença estatisticamente significativa entre crianças saudáveis ($p=0,2876$) e do GI ($p=0,8872$), estando elas com (ceo-s>0) ou sem cárie (ceo-s=0) (Tabela 25).

5.6 Hipoplasia de Esmalte

Hipoplasia de esmalte não foi um achado comum entre crianças desnutridas, com manifestação em apenas 3 crianças (2,5%), sendo uma do grau II (26 meses-hipoplasia nos incisivos centrais superiores) e duas crianças do grau III (28 meses-hipoplasia nos caninos superiores e molares; 58 meses-hipoplasia nos caninos superiores). Dessas crianças apenas uma criança do grau III teve também lesões de cárie. Quatro crianças saudáveis (8,51%) apresentaram hipoplasia de esmalte, com 6 dentes afetados, consistindo de caninos e molares decíduos.

5.7 Concentração de Proteínas Totais Salivares

Quanto à CPT, houve diferença significativa entre os graus de desnutrição ($p=0,0004$) (Tabela 13) e entre os desnutridos e os saudáveis ($p=0,0000$) (Tabela 14). Não se observou diferença significativa ao comparar GI e GII ($p=0,2035$) (Tabela 26). Ao comparar GI/GII e os saudáveis, entretanto, a diferença entre os grupos foi observada ($p=0,0000$) (Tabela 27). O GIII apresentou maior CPT quando comparado a GI/GII ($p=0,0002$) (Tabela 28), não havendo diferença entre as crianças saudáveis e as crianças desnutridas GIII ($p=0,5309$) (Tabela 29). Em relação à S-CPI, não houve diferença na CPT, seja na presença ou ausência de severidade ($p=0,6015$) (Tabela 30). Houve correlação entre CPT e idade ($p=0,0078$), mas CPT não se correlacionou com ceo-s ($p=0,5651$) nem com a contagem de EGM ($p=0,2162$) entre as crianças desnutridas e saudáveis (Correlação de Monotonicidade de Spearman) (Tabela 12). Assim, crianças severamente desnutridas apresentam CPT semelhante aos níveis observados nas crianças saudáveis e nutridas.

5.8 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e β -mercaptoetanol

Quando se realizou a eletroforese das proteínas salivares, 20 bandas protéicas puderam ser observadas. Os pesos moleculares dessas proteínas variaram entre $5,58\pm 0,1$ e $149,35\pm 0,0$ KDa (Figuras 1, 2, 3 e 4). Onze bandas protéicas foram expressas em todos os grupos estudados: $10,93\pm 0,76$ (3^a); $12,76\pm 1,0$ (4^a); $16,48\pm 1,12$ (5^a); $25,27\pm 1,16$ (7^a); $33,01\pm 1,39$ (8^a); $43,46\pm 2,22$ (10^a); $54,12\pm 2,10$ (11^a); $63,98\pm 1,26$ (12^a); $74,26\pm 0,92$ (13^a); $86,57\pm 1,89$ (14^a); $123,56\pm 4,35$ (17^a). As bandas protéicas de pesos moleculares $5,58\pm 0,10$ (1^a) e $8,16\pm 0,27$ (2^a) só apareceram nos grupos GN e GII; as bandas protéicas de pesos moleculares $22,05\pm 0,35$ (6^a) e $37,10\pm 1,38$ (9^a) só apareceram nos grupos GII e GIII; a banda protéica de peso molecular $131,24\pm 0,00$ (18^a) só apareceu no grupo GIII e a banda protéica de peso molecular $149,35\pm 0,00$ (20^a) só foi observada no grupo GII. A banda protéica mais frequentemente observada foi

a de peso molecular $43,46 \pm 2,22$ (10^a), exibida em 75,60% da população estudada. O grupo que teve mais bandas protéicas foi o GII, com 19 bandas, e o que teve menor número de bandas protéicas foi o GI, com 11 (Tabela 31).

Investigando experiência de cárie, observou-se não haver diferença na expressão das bandas protéicas ao se comparar crianças com e sem experiência de cárie, nos grupos GN, GI e GII. No grupo GIII a banda protéica de peso molecular $123,56 \pm 4,35$ (17^a) só foi observada em crianças sem experiência de cárie (Tabela 32) (Gráfico 1).

Em relação à presença de bandas protéicas quanto à presença ou não de EGM, nos grupos GN, GI e GII, não houve diferenças. No grupo GIII, a banda protéica $74,26 \pm 0,92$ (13^a), só apareceu na ausência de EGM (níveis indetectáveis) (Tabela 33) (Gráfico 2).

Tabela 1- Distribuição das crianças por idade quanto ao grau de desnutrição e ao sexo em relação à presença ou ausência de cárie dentária (cavitada ou não cavitada).

<i>IDADE EM MESES</i>	<i>CRIANÇAS SEM CÁRIE</i>						<i>CRIANÇAS COM CÁRIE</i>					
	<i>GI</i>		<i>GII</i>		<i>GIII</i>		<i>GI</i>		<i>GII</i>		<i>GIII</i>	
	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>
12-23	1	4	6	11	11	3	-	-	-	-	2	-
24-35	3	3	5	5	2	1	2	3	-	-	-	-
36-47	2	1	1	6	1	1	3	2	2	4	1	2
48-59	1	1	-	2	1	1	-	2	5	3	1	3
60-70	-	-	1	1	-	-	2	1	2	5	-	-
TOTAL	7	9	13	25	15	6	7	8	9	12	4	5
TOTAL POR GRAU DE DESNUTRIÇÃO	16		38		21		15		21		9	
TOTAL COM E SEM CÁRIE			75						45			
TOTAL DA POPULAÇÃO	120											

Tabela 2. Distribuição dos sexos entre as crianças nutridas e para cada grau de desnutrição. Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

<i>SEXO</i>	<i>ESTADOS NUTRICIONAIS</i>				<i>TOTAL</i>
	<i>GN</i>	<i>GI</i>	<i>GII</i>	<i>GIII</i>	
MASCULINO	27	14	22	20	83
FEMININO	21	17	37	10	85
TOTAL	48	31	59	30	168
p-valor	0,4709	0,7201	0,0674	0,0987	

Tabela 3. Comparação das variáveis: idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s entre os sexos, nos nutridos e para cada grau de desnutrição. Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

<i>ESTADOS NUTRICIONAIS</i>		<i>IDADE</i>	<i>CONTAGEM DE EGM</i>	<i>CPT</i>	<i>ceo-s</i>
GN	Mann-Whitney U	265	247	212	273
	Z	-0,396	-0,776	-1,306	-0,248
	p-valor	0,6922	0,4375	0,1915	0,8043
GI	Mann-Whitney U	94	111	77	117
	Z	-0,993	-0,343	-1,476	-0,086
	p-valor	0,3358	0,7395	0,1417	0,9532
GII	Mann-Whitney U	404	353	367	405
	Z	-0,047	-0,896	-0,635	-0,037
	p-valor	0,9625	0,3705	0,5254	0,9708
GIII	Mann-Whitney U	34	58	70	67
	Z	-2,910	-1,927	-1,320	-1,818
	p-valor	0,0028	0,0673	0,1980	0,1426

Tabela 4. Comparação das idades, nos diferentes estados nutricionais, com e sem experiência de cárie. Teste t-Student para amostras independentes ($p < 0,05$).

<i>ESTADOS NUTRICIONAIS</i>	<i>ceo-s</i>	<i>n</i>	<i>MÉDIA</i>	<i>t</i>	<i>p-valor</i>
GN	não	25	56,8	-1,376	0,1754
	sim	23	62,7		
GI	não	16	29,9	-2,894	0,0071
	sim	15	43,1		
GII	não	38	30,1	-7,831	0,0000
	sim	21	54,0		
GIII	não	21	23,6	-3,249	0,0030
	sim	9	41,4		

Tabela 5. Comparação das idades, nas crianças com experiência de cárie, entre os diferentes graus de desnutrição. Teste t-Student para amostras independentes ($p < 0,05$).

<i>GRAUS DE DESNUTRIÇÃO</i>	t	p-valor
GI X GII	2,894	0,0066
GII X GIII	2,157	0,0560
GI X GIII	0,275	0,7860

Tabela 6- Distribuição das crianças quanto à localização das lesões de cárie (cavitada ou não cavitada) para cada grau de desnutrição.

<i>LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES</i>	<i>GI</i>	<i>GII</i>	<i>GIII</i>
ANTERIOR			
1 Lesão *	-	-	-
2 Lesões ou mais	2	2	2
Mancha branca **	-	-	1
POSTERIOR			
1° Molar	3	-	2
2° Molar	3	9	-
1° e 2° Molar	2	1	2
Mancha branca	-	-	-
ANTERIOR E POSTERIOR			
Lesões	4	8	2
Mancha branca	1	1	-

*Lesões correspondem aos pacientes que apresentaram cavitações, podendo ter também lesões de não-cavidades

**Manchas brancas correspondem aos pacientes que só apresentaram lesões não cavitadas.

Tabela 7- Distribuição das crianças nutridas por idade e sexo em relação à presença ou não de cárie (cavitada ou não cavitada).

<i>IDADE EM MESES</i>	<i>CRIANÇAS SEM CÁRIE</i>		<i>CRIANÇAS COM CÁRIE</i>	
	<i>MASCULINO</i>	<i>FEMININO</i>	<i>MASCULINO</i>	<i>FEMININO</i>
36-47	1	1	1	4
48-59	7	1	3	2
60-70	3	5	4	4
71-85	3	1	3	3
TOTAL	14	8	11	14
TOTAL COM E SEM CÁRIE	22		25	
TOTAL DA POPULAÇÃO	47			

Tabela 8- Distribuição das crianças nutridas quanto à localização das lesões de cárie (cavitada ou não cavitada) para cada grau de desnutrição.

<i>LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES</i>	<i>CRIANÇAS NUTRIDAS</i>
ANTERIOR	
1 Lesão	-
2 Lesões ou mais	1
Mancha Branca	2
POSTERIOR	
1° Molar	4
2° Molar	5
1° e 2° Molar	5
Mancha Branca	-
ANTERIOR E POSTERIOR	
Lesões	8
Mancha Branca	-

Tabela 9 – Distribuição das crianças com cárie (ceo-d, ceo-s e S-CPI) por grau de desnutrição e sexo, segundo AAPD.

GRAU DE DESNUTRIÇÃO	Nº DE IDENTIFICAÇÃO	IDADE (meses)	SEXO	ceo-d	ceo-s	S-CPI	CONTAGENS DE EGM
GI	78	26	M	2	2	*	0
GI	54	27	F	2	2	*	36.500
GI	70	27	F	4	4	*	9.025
GI	71	31	F	1	1	*	26.500
GI	50	33	F	1	1	*	0
GI	60	36	F	3	3		39.000
GI	43	38	M	2	2	*	13.350
GI	72	42	M	2	2		0
GI	57	43	F	2	2	*	0
GI	100	45	M	4	4		2.225
GI	49	54	F	11	11	*	0
GI	56	57	F	9	15	*	164.000
GI	52	60	F	1	1		3.100
GI	93	61	M	8	19	*	13.725
GI	102	64	M	5	5		113.500
GII	28	37	F	4	4	*	396.500
GII	86	41	F	11	13	*	17.750
GII	11	43	M	1	1		500
GII	32	44	F	4	4		0
GII	30	45	M	1	1		0
GII	92	47	F	4	4	*	8.500
GII	18	48	F	2	2	*	26.000
GII	35	49	M	2	2	*	200
GII	61	53	F	4	4	*	35.500
GII	7	55	M	9	15	*	0
GII	24	56	F	4	4		39.500
GII	81	56	M	2	2	*	3.600
GII	63	58	M	3	3	*	0
GII	77	59	M	4	4		44.650
GII	51	6	F	6	8	*	250.000
GII	26	61	F	2	3		178.500
GII	3	62	F	3	7	*	47.000
GII	16	63	M	3	3		1.650
GII	59	64	M	1	1		9.100
GII	20	65	F	10	12	*	0
GII	17	70	F	10	17	*	614.000
GIII	98	15	M	4	4	*	1.175
GIII	109	18	M	1	1	*	0
GIII	88	37	F	4	6	*	42.025
GIII	104	37	F	1	1		0
GIII	94	43	M	3	3	*	18.500
GIII	107	51	F	6	7	*	2.700
GIII	112	56	F	20	72	*	102.500
GIII	120	58	F	6	7	*	14.400
GIII	116	58	M	8	8	*	162.000
TOTAL DE CRIANÇAS	45					30	

*Crianças que apresentam severidade da CPI

Tabela 10 – Distribuição dos dentes cariados em relação à idade (meses) e quanto ao grau de desnutrição.

<i>IDADE</i> (meses)	<i>IC</i>			<i>IL</i>			<i>C</i>			<i>1ºM</i>			<i>2ºM</i>			<i>TOTAL</i> (idade)
	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	
SUPERIOR																
12-23	-	-	2	-	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	5
24-35	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
36-47	4	4	1	-	2	2	-	1	-	-	2	2	2	4	-	22
48-59	4	9	2	1		3	-	-	2	3	2	7	3	7	5	50
60-71	-	2	-	-	1	-	1	3	-	1	3	-	4	11	-	26
TOTAL	8	15	5	4	3	7	1	4	3	4	7	9	9	22	5	106
		28			14			8			20			36		106
INFERIOR																
12-23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24-35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	7
36-47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	3	5	10	-	22
48-59	-	-	2	1	-	2	-	-	2	4	4	7	4	8	8	42
60-71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	4		5	10	-	22
TOTAL	-	-	2	1	-	2	-	-	2	16	10	10	14	28	8	93
		2			3			2			36			50		93

Tabela 11 – Distribuição das lesões de cárie nas crianças desnutridas por superfície dentária em relação à idade (meses).

<i>IDADE</i> (meses)	<i>SUPERIOR</i>					<i>INFERIOR</i>					<i>TOTAL</i> (idade)
	IC	IL	C	1°M	2°M	IC	IL	C	1°M	2°M	
12-23	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-	5
24-35	-	3	-	-	-	-	-	-	7	-	10
36-47	11	4	1	8	4	-	-	-	15	16	59
48-59	25	14	2	18	23		1	7	28	29	147
60-71	2	1	4	7	23	-	-	-	18	21	76
TOTAL (superfícies)	40	24	8	33	50		1	7	68	66	297

Tabela 12. Correlação de monotonicidade entre as variáveis idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, com as crianças nutridas e desnutridas. Coeficiente de correlação de Spearman ($p < 0,05$).

<i>VARIÁVEIS</i>		<i>ceo-s</i>	<i>CONTAGEM DE EGM</i>	<i>CPT</i>
IDADE	Coeficiente de correlação	0,447	0,167	0,205
	p-valor	0,0000	0,0308	0,0078
	n	168	168	167
ceo-s	Coeficiente de correlação		0,278	0,045
	p-valor		0,0003	0,5651
	n		168	167
CONTAGEM DE EGM	Coeficiente de correlação			0,096
	p-valor			0,2162
	n			167

Tabela 13. Comparação das variáveis idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, nos diferentes graus de desnutrição, excluindo os pacientes saudáveis. Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

<i>ESPECIFICAÇÃO</i>	<i>IDADE</i>	<i>CONTAGEM DE EGM</i>	<i>CPT</i>	<i>ceos</i>
X²	7,71	1,25	15,61	1,29
n	120	120	119	120
p-valor	0,0212	0,5352	0,0004	0,5256

Tabela 14. Comparação das variáveis: idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, nos diferentes graus de desnutrição, com a inclusão dos saudáveis. Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

<i>ESPECIFICAÇÃO</i>	<i>IDADE</i>	<i>CONTAGEM DE EGM</i>	<i>CPT</i>	<i>ceos</i>
X²	58,25	2,16	33,56	1,83
n	168	168	167	168
p-valor	0,0000	0,5406	0,0000	0,6094

Tabela 15 - Distribuição do índice ceo-d e ceo-s (OMS) por grau de desnutrição e por idade.

GRAU DE DESNUTRIÇÃO	Nº DE IDENTIFICAÇÃO	IDADE (meses)	SEXO	ceo-d				ceo-s				
				B	D	E	TOTAL	B	D	E	TOTAL	
GI	78	26	M	2			2	2				2
GI	54	27	F	2			2	2				2
GI	71	31	F	1			1	1				1
GI	50	33	F	1			1	1				1
GI	60	36	F	3			3	3				3
GI	43	38	M	2			2	2				2
GI	72	42	M	2			2	2				2
GI	57	43	F	2			2	2				2
GI	100	45	M	4			4	4				4
GI	49	54	F	8	3		11	8	3			11
GI	56	57	F	9			9	15				15
GI	52	60	F	1			1	1				1
GI	93	61	M	6		2	8	9		10		19
GI	102	64	M	2			2	2				2
GII	28	37	F	2			2	2				2
GII	86	41	F	11			11	13				13
GII	11	43	M	1			1	1				1
GII	32	44	F	4			4	4				4
GII	30	45	M	1			1	1				1
GII	92	47	F	4			4	4				4
GII	18	48	F	2			2	2				2
GII	61	53	F	4			4	4				4
GII	7	55	M	9			9	15				15
GII	24	56	F	3	1		4	3	1			4
GII	81	56	M	2			2	2				2
GII	63	58	M	2			2	2				2
GII	77	59	M	4			4	4				4
GII	51	60	F	6			6	8				8
GII	26	61	F	2			2	3				3
GII	3	62	F	3			3	7				7
GII	16	63	M	3			3	3				3
GII	59	64	M	1			1	1				1
GII	20	65	F	10			10	12				12
GII	17	70	F	3	6		9	3	14			17
GIII	98	15	M	4			4	4				4
GIII	88	37	F	4			4	6				6
GIII	104	37	F	1			1	1				1
GIII	94	43	M	3			3	3				3
GIII	107	51	F	6			6	7				7
GIII	112	56	F	11		9	20	31		41		72
GIII	120	58	F	5			5	6				6
GIII	116	58	M	8			8	8				8
TOTAL				164	10	11	185	214	18	51		283

Tabela 16 – Distribuição das crianças com cárie (severa ou não) quanto ao grau de desnutrição e sexo por idade.

<i>IDADE</i> (anos)	<i>CPI</i>						<i>S-CPI</i>						<i>TOTAL</i>
	<i>GI</i>		<i>GII</i>		<i>GIII</i>		<i>GI</i>		<i>GII</i>		<i>GIII</i>		
	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	
< 3	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	2	-	7
3	2	1	2	1	-	1	1	1	-	3	1	1	14
4	-	-	1	2	-	-	-	2	4	1	2	2	14
5	1	1	2	1	-	-	1	-	-	4	-	-	10
	3	2	5	4	-	1	4	6	4	8	5	3	
TOTAL	5		9		1		10		12		8		45
			15						30				

Tabela 17. Comparação entre sexo e severidade da cárie dentária. Teste do Qui-Quadrado ($p < 0,05$).

<i>SEXO</i>	<i>SEVERIDADE</i>			<i>TOTAL</i>
	<i>SEVERA</i>	<i>NÃO-SEVERA</i>	<i>LIVRE DE CÁRIE</i>	
MASCULINO	19	12	52	83
FEMININO	21	16	48	85
TOTAL	40	28	100	168

p-valor: $p=0,6677$

Tabela 18. Comparação entre graus de desnutrição e severidade da cárie dentária. Teste do Qui-Quadrado ($p < 0,05$).

<i>SEXO</i>	<i>SEVERIDADE</i>		<i>TOTAL</i>
	<i>SEVERA</i>	<i>NÃO-SEVERA</i>	
GI	9	6	15
GII	13	8	21
GIII	8	1	9
TOTAL	30	15	45

p-valor: $p=0,2845$

Tabela 19. Comparação das variáveis idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, entre a presença e ausência de cárie, em que na presença estão incluídos os graus severo e não severo. Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

<i>ESPECIFICAÇÃO</i>	<i>IDADE</i>	<i>CONTAGEM DE EGM</i>	<i>PROTEÍNA</i>	<i>ceo-s</i>
Mann-Whitney U	1842,5	2277,5	3221	202,5
Z	-5,034	-3,754	-0,472	-11,648
n	168	168	167	168
p-valor	0,0000	0,0002	0,6367	0,0000

Tabela 20. Análises de variáveis em um modelo binário logístico.

<i>VARIÁVEIS</i>	<i>COEFICIENTE DE REGRESSÃO</i>	<i>ESTATÍSTICA DE WALD</i>	<i>GRAU DE LIBERDADE</i>	<i>SIGNIFICÂNCIA</i>
SEXO	-0,142	0,139	1	0,7094
GRAU DE DESNUTRIÇÃO	--	8,831	3	0,0316
GI	1,857	8,190	1	0,0042
GII	0,755	1,995	1	0,1578
GIII	1,466	4,343	1	0,0372
IDADE	0,081	29,099	1	0,0000
LOGARÍTMO DA CONTAGEM DE EGM	0,071	4,593	1	0,0321
CPT	-0,265	1,207	1	0,2720
CONSTANTE	-4,868	21,995	1	0,0000

Tabela 21 – Distribuição da contaminação por EGM em relação ao grau de desnutrição e ao sexo.

<i>Grau de Desnutrição</i>	<i>0</i>		<i>1-10⁴</i>		<i>10⁵</i>		<i>TOTAL</i>
	M	F	M	F	M	F	
GI	5	5	3	6	6	6	31
GII	10	18	8	5	4	14	59
GIII	11	2	4	4	4	5	30
TOTAL	26	25	15	15	14	25	120

Tabela 22 - Distribuição da contaminação por EGM em relação ao ceo-s.

<i>ceo-s</i>	<i>0</i>	<i>1-10⁴</i>	<i>10⁵</i>	<i>TOTAL</i>
0	39	19	17	75
1-5	9	10	12	31
5-10	-	1	5	6
>10	3		5	8
TOTAL	51	30	39	120

Tabela 23 - Distribuição dos níveis de contaminação de EGM em relação à idade.

<i>IDADE (meses)</i>	<i>0</i>	<i>1-10⁴</i>	<i>≥10⁵</i>	<i>TOTAL</i>
12-23	21	11	6	38
24-35	10	8	7	24
36-47	11	6	9	26
48-59	6	2	11	20
60-71	3	3	6	12
TOTAL	51	30	39	120
%	42,5	25	32,5	100

Tabela 24. Comparação das variáveis idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, entre os graus severo e não severo. Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

<i>ESPECIFICAÇÃO</i>	<i>IDADE</i>	<i>CONTAGEM DE EGM</i>	<i>CPT</i>	<i>ceo-s</i>
MANN-WHITNEY U	467	558	480	268
Z	-1,160	-0,031	-1,003	-3,699
n	68	68	68	68
p-valor	0,2461	0,9749	0,3158	0,0002

Tabela 25. Comparação dos logaritmos da contagem de EGM, nos diferentes estados nutricionais, com e sem experiência de cárie. Teste t-Student para amostras independentes ($p < 0,05$).

<i>ESTADOS NUTRICIONAIS</i>	<i>ceo-s</i>	<i>n</i>	<i>média</i>	<i>t</i>	<i>p-valor</i>
GN	não	25	5,94	-1,076	0,2876
	sim	23	7,57		
GI	não	16	7,82	-0,143	0,8872
	sim	15	8,12		
GII	não	38	4,80	-2,757	0,0078
	sim	21	9,30		
GIII	não	21	5,07	-1,946	0,0617
	sim	9	9,42		

Tabela 26. Comparação das variáveis idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, entre os graus de desnutrição leve e moderado. Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

<i>ESPECIFICAÇÃO</i>	<i>IDADE</i>	<i>CONTAGEM</i>	<i>DPR</i>	<i>ceo-s</i>
MANN-WHITNEY U	842	820	739	826
Z	0,616	0,839	1,272	0,850
n	90	90	89	90
p-valor	0,5380	0,4016	0,2035	0,3953

Tabela 27. Comparação das variáveis idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, entre os nutridos e os graus de desnutrição leve e moderado (juntos). Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

<i>ESPECIFICAÇÃO</i>	<i>IDADE</i>	<i>CONTAGEM DE EGM</i>	<i>CPT</i>	<i>ceo-s</i>
MANN-WHITNEY U	694	1967	998	2071
Z	6,556	0,894	5,137	0,442
n	138	138	137	138
p-valor	0,0000	0,3714	0,0000	0,6582

Tabela 28. Comparação das variáveis idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, entre o grau de desnutrição grave e os graus de desnutrição leve e moderado (juntos). Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

<i>ESPECIFICAÇÃO</i>	<i>IDADE</i>	<i>CONTAGEM DE EGM</i>	<i>CPT</i>	<i>ceo-s</i>
MANN-WHITNEY U	900	1243	725	1247
Z	2,731	0,678	3,737	0,719
n	120	120	119	120
p-valor	0,0063	0,4977	0,0002	0,4723

Tabela 29. Comparação das variáveis idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, entre os saudáveis e o grau de desnutrição grave. Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

<i>ESPECIFICAÇÃO</i>	<i>IDADE</i>	<i>CONTAGEM DE EGM</i>	<i>CPT</i>	<i>ceo-s</i>
MANN-WHITNEY U	122	717	659	629
Z	6,147	0,032	0,627	1,050
n	78	78	77	78
p-valor	0,0000	0,9747	0,5309	0,2936

Tabela 30. Comparação das variáveis idade, contagem de EGM, CPT e ceo-s, nos diferentes graus de severidade. Teste do Qui-Quadrado ($p < 0,05$).

<i>ESPECIFICAÇÃO</i>	<i>IDADE</i>	<i>CONTAGEM DE EGM</i>	<i>CPT</i>	<i>ceo-s</i>
X²	25,9	14,1	1,0	139,5
n	168	168	167	168
p-valor	0,0000	0,0009	0,6015	0,0000

Tabela 31. Média \pm (desvio-padrão) das massas moleculares das bandas protéicas em relação ao sexo, identificadas entre crianças saudáveis (GN), desnutridas em graus leve (GI), moderado (GII) e grave (GIII), associada à frequência das bandas em cada grupo. Massas moleculares expressas em kDa. Frequência das bandas expressas em termos numéricos.

MASSA MOLECULAR	GN		GI		GII		GIII		TOTAL NA POPULAÇÃO
	F	M	F	M	F	M	F	M	
149,35 \pm 0,0	0	0	0	0	4	1	0	0	5
143,23 \pm 0,97	1	5	0	0	5	0	0	9	20
131,24 \pm 0,00	0	0	0	0	0	0	1	8	9
123,56 \pm 4,35	10	10	3	3	5	3	2	3	39
109,42 \pm 6,12	8	2	0	0	14	9	2	6	41
95,38 \pm 3,44	7	9	0	0	8	8	3	3	38
86,57 \pm 1,89	6	5	1	3	7	4	2	6	34
74,26 \pm 0,92	4	6	1	2	9	7	1	2	32
63,984 \pm 1,26	16	19	8	3	17	13	5	9	90
54,12 \pm 2,10	8	7	7	8	21	7	5	9	72
43,46 \pm 2,22	18	26	13	10	22	17	7	14	127
37,10 \pm 1,39	0	0	0	0	30	18	10	19	77
33,01 \pm 0,43	13	16	11	12	5	2	6	8	73
25,27 \pm 1,16	18	21	10	8	23	16	4	11	111
22,05 \pm 0,35	0	0	0	0	12	3	3	6	24
16,48 \pm 1,12	9	13	9	7	4	3	5	9	59
12,76 \pm 1,00	14	21	10	5	16	7	5	9	87
10,93 \pm 0,76	4	4	11	8	21	15	6	8	77
8,16 \pm 0,27	13	5	0	0	9	6	0	0	33
5,58 \pm 0,10	10	10	0	0	3	6	0	0	29

Tabela 32. Média \pm (desvio-padrão) das massas moleculares das bandas protéicas em relação à experiência de cárie ou não, identificadas entre crianças saudáveis (GN), desnutridas em graus leve (GI), moderado (GII) e grave (GIII), associada à frequência das bandas em cada grupo. Massas moleculares expressas em kDa. Frequência das bandas expressas em termos numéricos.

<i>MASSA MOLECULAR</i>	<i>GN</i>		<i>GI</i>		<i>GII</i>		<i>GIII</i>		<i>TOTAL NA POPULAÇÃO</i>
	<i>ceo-s =0</i>	<i>ceo-s >0</i>	<i>ceo-s =0</i>	<i>ceo-s >0</i>	<i>ceo-s =0</i>	<i>ceo-s >0</i>	<i>ceo-s =0</i>	<i>ceo-s >0</i>	
149,35 \pm 0,0	0	0	0	0	4	1	0	0	5
143,23 \pm 0,97	3	3	0	0	4	1	8	1	20
131,24 \pm 0,00	0	0	0	0	0	0	7	2	9
123,56 \pm 4,35	9	11	4	2	6	2	5	0	39
109,42 \pm 6,12	3	7	0	0	13	10	6	2	41
95,38 \pm 3,44	7	9	0	0	13	3	4	2	38
86,57 \pm 1,89	7	4	3	1	6	5	7	1	34
74,26 \pm 0,92	5	5	1	2	9	7	2	1	32
63,984 \pm 1,26	19	16	3	8	19	11	9	5	90
54,12 \pm 2,10	9	6	8	7	18	10	11	3	72
43,46 \pm 2,22	25	19	9	14	24	15	16	5	127
37,10 \pm 1,39	0	0	0	0	33	15	20	9	77
33,01 \pm 0,43	15	8	13	10	6	1	9	5	73
25,27 \pm 1,16	23	16	8	10	24	15	12	3	111
22,05 \pm 0,35	0	0	0	0	10	5	7	2	24
16,48 \pm 1,12	5	9	7	9	5	2	8	6	59
12,76 \pm 1,00	18	17	7	8	12	11	8	6	87
10,93 \pm 0,76	3	5	9	10	22	14	9	5	77
8,16 \pm 0,27	9	9	0	0	9	7	0	0	33
5,58 \pm 0,10	8	12	0	0	7	2	0	0	29

Tabela 33. Média \pm (desvio-padrão) das massas moleculares das bandas protéicas em relação à contaminação por EGM ou não, identificadas entre crianças saudáveis (GN), desnutridas em graus leve (GI), moderado (GII) e grave (GIII), associada à frequência das bandas em cada grupo. Massas moleculares expressas em kDa. Frequência das bandas expressas em termos numéricos.

MASSA MOLECULAR	GN		GI		GII		GIII		TOTAL NA POPULAÇÃO
	EGM =0	EGM >0	EGM =0	EGM >0	EGM =0	EGM >0	EGM =0	EGM >0	
149,35 \pm 0,0	0	0	0	0	1	4	0	0	5
143,23 \pm 0,97	1	5	0	0	1	4	5	4	20
131,24 \pm 0,00	0	0	0	0	0	0	4	5	9
123,56 \pm 4,35	8	12	2	4	1	7	3	2	39
109,42 \pm 6,12	2	8	0	0	2	21	4	4	41
95,38 \pm 3,44	2	14	0	0	3	13	3	3	38
86,57 \pm 1,89	4	7	2	2	2	9	4	4	34
74,26 \pm 0,92	5	5	1	2	5	11	3	0	32
63,984 \pm 1,26	10	25	3	8	4	26	7	7	90
54,12 \pm 2,10	6	9	4	11	7	21	5	9	72
43,46 \pm 2,22	14	30	8	15	11	28	10	11	127
37,10 \pm 1,39	0	0	0	0	10	38	13	16	77
33,01 \pm 0,43	6	23	8	15	2	5	6	8	73
25,27 \pm 1,16	13	26	5	13	9	30	6	9	111
22,05 \pm 0,35	0	0	0	0	3	12	6	3	24
16,48 \pm 1,12	6	16	6	10	6	1	6	8	59
12,76 \pm 1,00	8	27	6	9	5	18	8	6	87
10,93 \pm 0,76	1	7	6	13	6	30	6	8	77
8,16 \pm 0,27	4	14	0	0	1	14	0	0	33
5,58 \pm 0,10	5	15	0	0	0	9	0	0	29

Gráfico 1. Distribuição das proteínas salivares de crianças saudáveis e de crianças com diferentes graus de desnutrição (leve, moderada e grave), sem cárie (C-) e com cárie (C+) nas faixas de 0-20 kDa, 20-40 kDa, 40-80 kDa e 80-160 kDa.

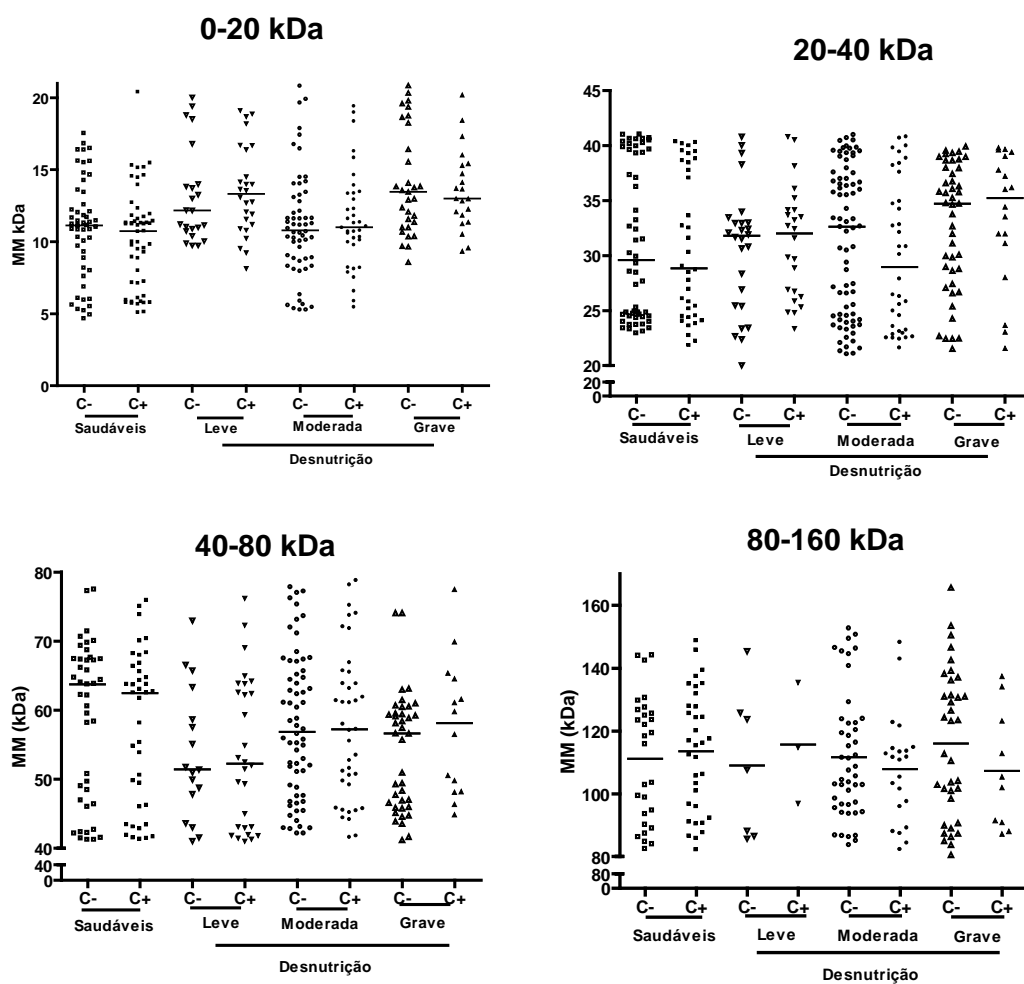
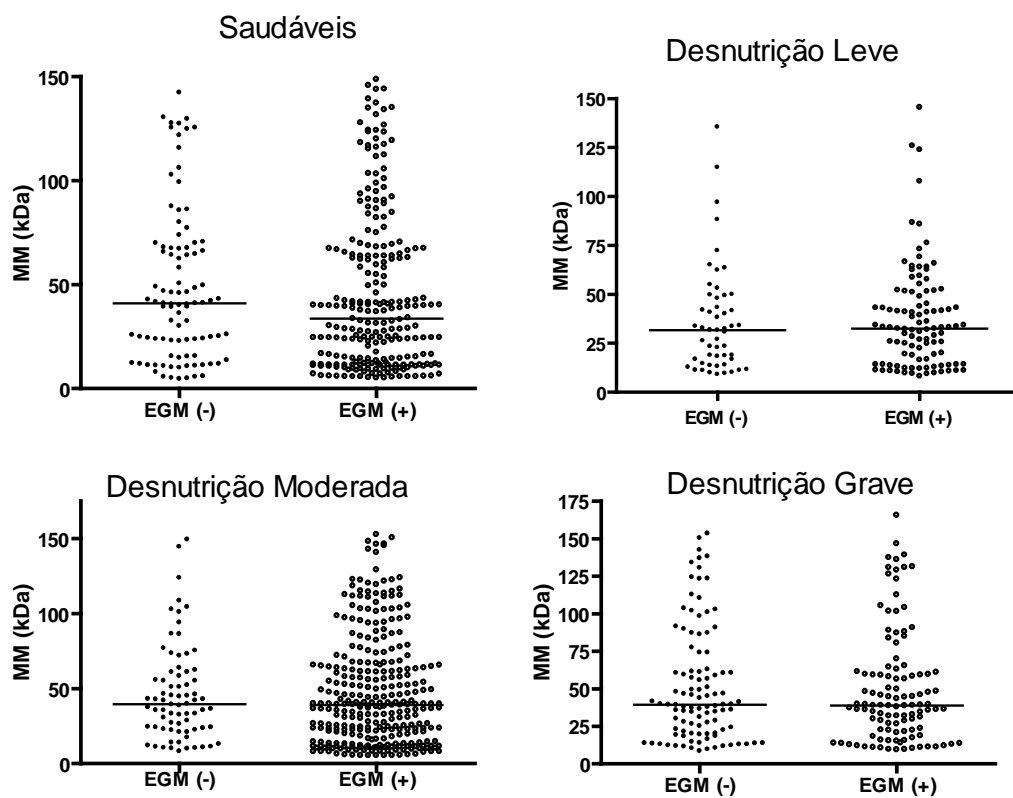


Gráfico 2. Distribuição das proteínas salivares de crianças saudáveis e de crianças com diferentes graus de desnutrição (leve, moderada e grave), com EGM (+) e sem EGM (-).



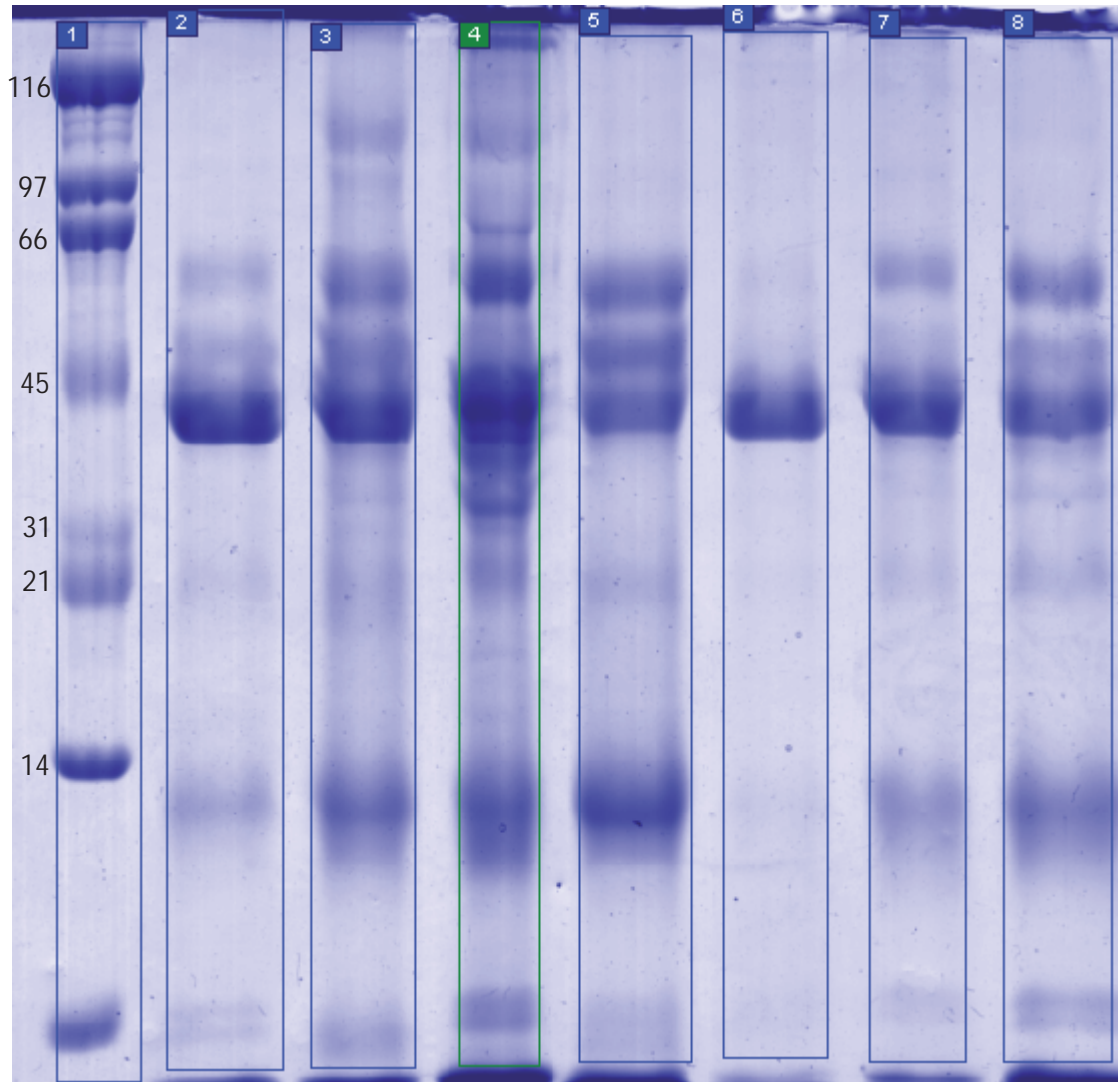


Figura 1. Gel de Poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) mostrando perfis de proteínas de saliva não estimulada de um grupo de crianças saudáveis sem cárie (colunas 3, 7 e 8) e com cárie (colunas 2, 4, 5 e 6). A 1ª coluna é o marcador do peso molecular.

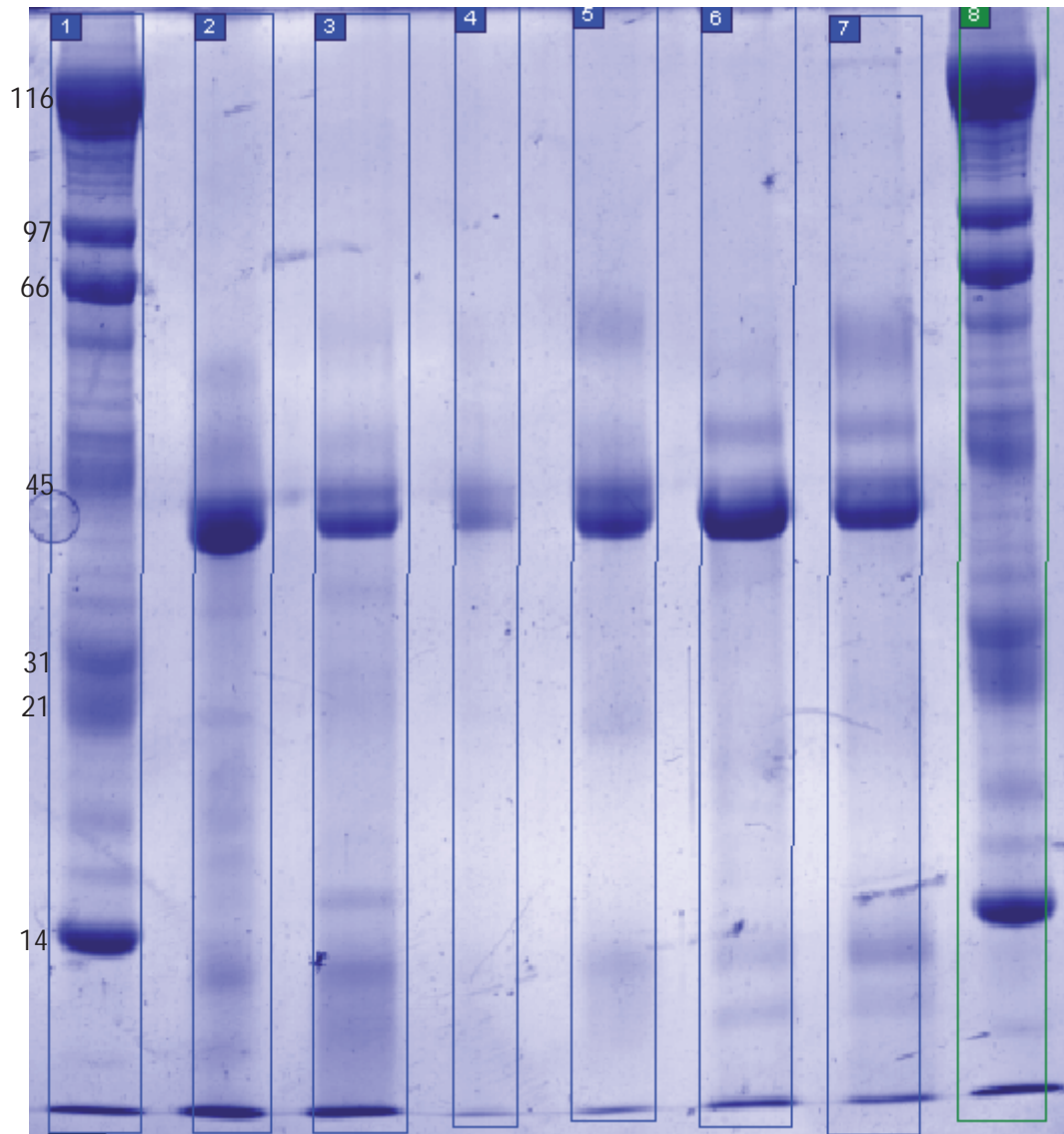


Figura 2. Gel de Poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) mostrando perfis de proteínas de saliva não estimulada de um grupo de crianças GI sem cárie (colunas 5 e 7) e com cárie (colunas 2, 3, 4 e 6). Nas colunas 1 e 8: marcador do peso molecular.

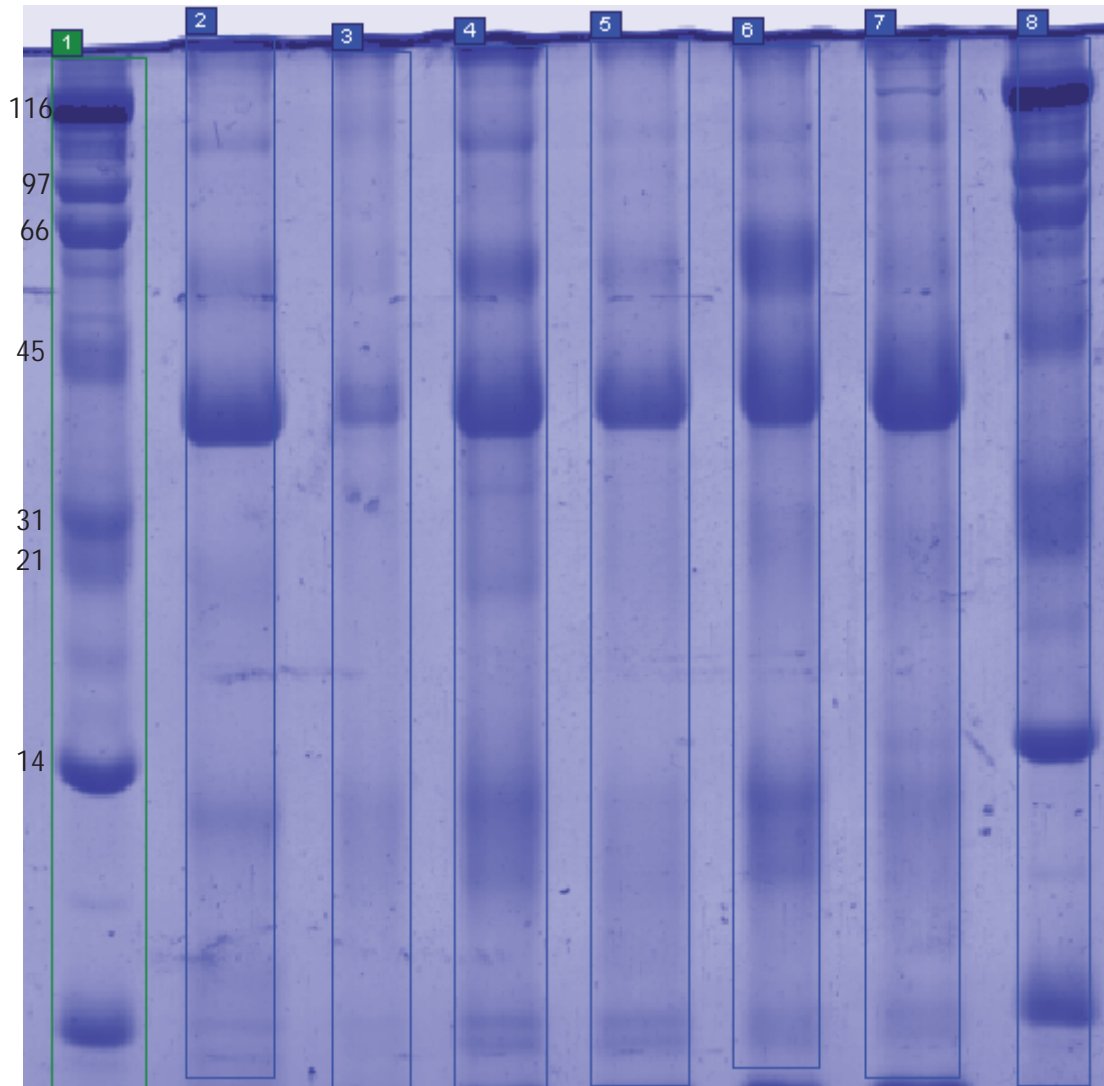


Figura 3. Gel de Poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) mostrando perfis de proteínas de saliva não estimulada de um grupo de crianças GII sem cárie (colunas 2, 4 e 5) e com cárie (colunas 3, 6 e 7). Nas colunas 1 e 8: marcador do peso molecular.

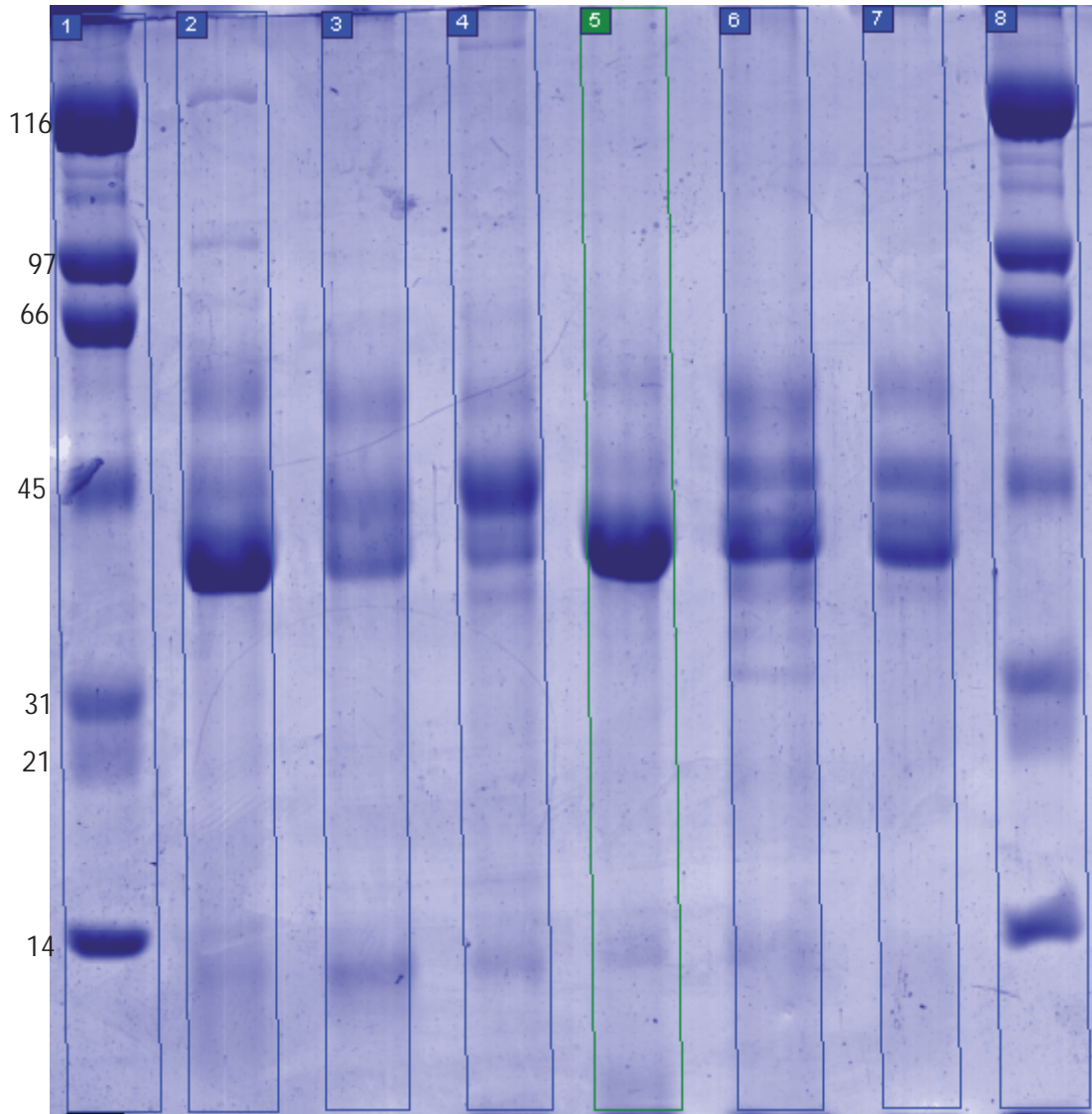


Figura 4. Gel de Poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) mostrando perfis de proteínas de saliva não estimulada de um grupo de crianças GIII sem cárie (colunas 3, 4 e 6) e com cárie (colunas 2, 5 e 7). Nas colunas 1 e 8: marcador do peso molecular.

6 DISCUSSÃO

A amostra estudada foi caracterizada por apresentar DEP em seus três diferentes graus. Desnutrição no início da infância tem importância na ocorrência de cárie na dentição decídua, e, em relação aos fatores do hospedeiro no que se relaciona à cárie, afeta principalmente o sistema salivar e a estrutura do esmalte (PSOTER *et al.*, 2005).

Alguns estudos apontam uma correlação entre experiência de cárie e desnutrição (ALVAREZ *et al.*, 1988,1990,1993,1995; JOHANSON *et al.*, 1992; LI *et al.*, 1996; PETTI *et al.*, 2000). Deficiência nutricional tem importante impacto no desenvolvimento dentário e suscetibilidade as doenças dentais (LI *et al.*, 1996). Muitos nutrientes específicos são associados com a formação, calcificação e erupção dentária; e deficiências na dieta aumentam a suscetibilidade a cárie (ALVAREZ; NAVIA, 1989). Após a erupção, maturação e calcificação dos dentes recém-irrompidos são possibilitadas, por meio de uma dieta adequada em proteína, cálcio, fosfato, vitaminas (C e D) e alguns elementos traços da saliva (MCDONALD; AVERY, 1986). Indivíduos que experimentaram severa deficiência nutricional mostram defeitos dentários em número, coloração, estrutura, textura e espessura da superfície do esmalte. Tais defeitos podem tornar os dentes de alto risco ao desenvolvimento de cárie após emergência destes na cavidade bucal (LI *et al.*, 1996).

CPI é uma doença crônica, infecciosa, transmissível, de etiologia complexa e multifatorial, mas é uma condição capaz de ser prevenida. Caracterizada pela cárie nos dentes decíduos tão logo erupcionem. Na forma severa, suas manifestações incluem: cárie rampante, dor, infecção, abscessos, dificuldades na mastigação, desnutrição, distúrbios gastrointestinais e baixa auto-estima (RAMOS-GOMEZ *et al.*, 2002). Deficiência nutricional pode ser responsável tanto pela redução do peso corporal quanto pela cárie. Da mesma forma, a dor ou infecção associada à cárie dentária pode causar dificuldade na alimentação das crianças. Logo, criança com cárie tem fatores de risco para a saúde e desconforto (TINANOFF; O'SULLIVAN, 1997).

Os principais fatores na etiologia da doença cárie são: bactérias cariogênicas, carboidratos fermentáveis, hospedeiro e dentes suscetíveis aliados ao tempo. Em crianças pequenas, entretanto, a flora bacteriana e os fatores de defesa do hospedeiro estão em desenvolvimento, as superfícies dentárias estão recém-erupcionadas e podem apresentar defeitos hipoplásicos, encontram-se numa fase alimentar de transição da dieta da amamentação/mamadeira para os primeiros alimentos sólidos e sabores infantis. Dessa forma, o fator de risco para cárie em bebês e crianças jovens não pode ser considerado único (SEOW, 1998).

Em estudos seccional e longitudinal em crianças peruanas, demonstrou-se que desnutrição crônica no início da vida tem forte influência no atraso da erupção e esfoliação dentárias. Além disso, a distribuição da cárie dental é intensivamente influenciada pelo fator idade, resultando em aumento da experiência de cárie nos dentes decíduos (ALVAREZ *et al.*,

1988, 1990, 1993). Um só episódio de desnutrição ocorrido durante o 1º ano de vida é suficiente para causar atraso na erupção de todos os dentes decíduos, bem como apenas um episódio de desnutrição moderada ocorrendo antes de 1 ano de idade resulta no aumento de cárie dentária em épocas posteriores da vida, possivelmente como consequência do efeito deletério na formação do esmalte dentário nos estádios iniciais da vida, ou seja, desnutrição no início da vida, quando os dentes estão sendo formados, aumentará a suscetibilidade à cárie dental 3-4 anos depois (ALVAREZ, 1995). Quando a desnutrição na infância se prolonga, um significativo aumento na experiência de cárie ocorre aos 4 anos de idade (ALVAREZ *et al.*, 1993).

A significativa mudança na distribuição da cárie dental por idade nos dentes decíduos tem implicações importantes nos estudos epidemiológicos da doença. Primeiro porque os dados devem ser ajustados por idade (crescimento esquelético) para que possa haver comparações entre países ou regiões de um mesmo país. Segundo, o fato de molares decíduos cariados permanecerem 2-3 anos a mais na cavidade bucal de crianças com desnutrição, numa idade em que a maioria dos dentes permanentes emergem, pode aumentar o nível de bactérias cariogênicas na boca, aumentando o risco de desenvolvimento de cárie na dentição permanente (ALVAREZ *et al.*, 1990).

No presente trabalho, não foi observada diferença estatística entre os diferentes estados nutricionais (saudáveis e desnutridos) e as variáveis níveis de EGM, experiência e severidade de CPI, quanto ao sexo, Li *et al.* (1996) também não encontraram diferenças entre os sexos quanto à experiência de cárie, mas Infante e Gillespie (1976), estudando crianças guatemaltecas desnutridas, encontraram uma maior experiência de cárie em meninos na dentição decídua.

Das 120 crianças examinadas (idade média 41 meses), 75 crianças não apresentaram lesão de cárie (62,5%). As crianças com cárie (45 crianças, 37,5%) foram categorizadas quanto à localização das lesões como tendo cárie só em dentes anteriores, só em dentes posteriores ou ambos, para cada grau de desnutrição. Cáries em dentes anteriores foram encontradas em 7 crianças (15,55%); em dentes posteriores, foram encontradas em 22 crianças (48,89%) e em 16 crianças (35,56%) tanto em dentes anteriores como em posteriores. O'Sullivan e Tinanoff (1993) apresentaram dados semelhantes, relativos à prevalência da doença e percentual de crianças com lesões em dentes anteriores, que foi de 44% e 16%, respectivamente. De forma semelhante, Halett e O'Rourke (2006) encontraram valores semelhantes de 33,7% e 12,3%. A prevalência de cárie em dentes posteriores, no entanto, difere nesses dois estudos com relatos de 62,85% (O'SULLIVAN; TINANOFF, 1993) e 21,4% (HALETT; O'ROURKE, 2006). Em 1998, Mattos-Graner *et al.* encontraram uma prevalência de cárie total de 35,9% e, em 2002, Ramos-Gomez *et al.* encontraram de 43%. Outros estudos também diferem na prevalência de cárie descrita. Petti *et al.* (2000) encontraram valores de 27,3% na prevalência de cárie total e de 7,6% na prevalência de cárie nos dentes anteriores. Em 1995, Hallonsten *et al.* encontraram prevalência de cárie total de 2,1% e em 2006, Ersin *et al.* (2006) encontraram prevalência total de 9% e Bankel *et al.* (2006) de 13%. Holbrook *et al.* (1989), porém encontraram em seus estudos uma prevalência de cárie total de 54,2%; Bretz *et al.* (1992) de 83,8%; Douglass *et al.*

(1996) de 95%; Li *et al.* (1996) de 82,3%; Ölmez *et al.* (2003) de 70,5% e Vachirarojpisan *et al.* (2004) de 82,8%.

No presente estudo, o dente mais afetado por cárie foi o segundo molar inferior, seguido do primeiro molar inferior. A face mais acometida foi a oclusal dos segundos molares inferiores, com 15,3% das faces acometidas. Esses achados estão em concordância com os achados de Mattos-Graner *et al.* (1998) e Douglass *et al.* (1996) e diferem dos achados de Grindefjord *et al.* (1993); Hallostén *et al.* (1995) e Nobre dos Santos *et al.* (2002), em que os dentes anteriores foram mais acometidos. Na pesquisa de Bankel *et al.* (2006), as crianças de 2 anos de idade tiveram os dentes anteriores mais acometidos (66%), contudo o grupo das crianças de 3 anos de idade apresentou maior envolvimento dos dentes posteriores (50%). A incidência maior de cárie nos 2^{os} molares decíduos, apesar de esses estarem há menos tempo expostos na cavidade bucal, tendo em vista que erupcionam em média 1 ano após os 1^{os} molares decíduos, pode decorrer de os 2^{os} molares decíduos serem os dentes a terem suas coroas sendo formadas após 6 meses de vida, quando ocorre o desmame e aumenta o risco de desnutrição (ALVAREZ *et al.*, 1988) ou ao grande aumento nos níveis de EGM com a erupção dos 2^{os} molares decíduos (FUJIWARA *et al.*, 1991) ou ainda pelas mudanças deletérias significativas na dieta, uma vez que essas crianças ingressam na pré-escola por essa época (HOLBROOK *et al.*, 1995)

Apenas 7 crianças apresentaram manchas brancas (5,84%), sendo que destas, apenas 3 crianças (42,85%), uma em cada grau de desnutrição, apresentaram cárie, somente na forma manchas brancas. Esses achados são menores quando comparados com outros estudos. No estudo de Mattos-Graner *et al.* (1998), 28,88% das crianças apresentaram lesões de mancha branca, onde 47% só apresentaram lesões de mancha branca. De semelhante modo, Milgrom *et al.* (2000) descreveram 46,8% das crianças examinadas com presença de lesões de mancha branca.

Presentemente, foi também observado aumento da experiência de cárie com a idade como previamente descrito por Fujiwara *et al.*, 1991 e Milgrom *et al.*, 2000; dado este não observado por Zoitopoulos *et al.* (1996), talvez em razão da estreita faixa etária estudada pelos autores. Os índices ceo-d e ceo-s médios foram de 1,65 e 2,47, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com o encontrado em Hallett e O'Rourke (2006) que foi de 1,4 (ceo-d) e 2,28 (ceo-s). Valores superiores encontrados no estudo de Zoitopoulos *et al.* (1996), entretanto, que teve ceo-s médio de 0,36 aos 3 anos de idade e de 0,51 aos 4 anos de idade em população de crianças afrocaribenhas e de 0,80 e 1,48 para as crianças caucasianas nas respectivas faixas etárias. De forma semelhante, Mattos-Graner *et al.* (1998a) encontraram um ceo-s médio de 1,32; enquanto Ersin *et al.* (2006) encontraram um ceo-s médio de 0,6. Esse valor, contudo, foi inferior ao encontrado por Infante e Gillespie (1976), que tiveram em seu estudo um ceo-d médio de 3,43 e um ceo-s médio de 5,42. Holbrook *et al.* (1989) reportaram um ceo-d médio de 2,4 e ceo-s médio de 3,3. Em 1996, Douglass *et al.* (1996) encontraram índices de 8,3 e 19,2; e Li *et al.* (1996) encontraram índices de 5,6 e 11; para ceo-d e ceo-s, respectivamente. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre experiência de cárie e sexo, o que também foi encontrado por Milgrom *et al.* (2000) e Petti *et al.* (2000).

As crianças desnutridas GI e GIII apresentaram maior risco de cárie em relação às crianças saudáveis, o que não ocorreu com GII. Apesar de a maioria dos estudos envolvendo crianças desnutridas apontar uma relação entre desnutrição e cárie dentária (ALVAREZ *et al.*, 1988,1990,1993,1995; JOHANSON *et al.*, 1992; LI *et al.*, 1996; PETTI *et al.*, 2000), uma explicação para a proteção de GII pode ser dada em razão da presença de duas bandas protéicas que só aparecem nas crianças saudáveis e nas crianças do grupo GII, não aparecendo nas crianças desnutridas do grupo GI e GIII.

Crianças com CPI são infectadas com altos níveis de EGM, geralmente adquiridos em idades bem jovens de suas mães (SEOW, 1998; TINANOFF; O'SULLIVAN, 1997). A patogenicidade dos microorganismos, associada com o consumo freqüente de alimentos ricos em carboidratos, produz ácidos orgânicos que reduzem o pH da placa dental, levando à desmineralização do dente (SEOW, 1998). No presente estudo, a contaminação por EGM está fortemente associada com o aparecimento de CPI, o que também é visto na maioria das pesquisas (FUJIWARA *et al.*, 1991; MATTE *et al.*, 1992; O'SULLIVAN; TINANOFF, 1993; LI *et al.*, 1994; HALLOSTEN *et al.*, 1995; DOUGLASS *et al.*, 1996; THIBODEAU; O'SULLIVAN, 1996; MATTOS-GRANER *et al.*, 1998, 1998^a, 2001; MILGRON *et al.*, 2000; PETTI *et al.*, 2000; NOBRE DOS SANTOS *et al.*, 2002; RAMOS-GOMEZ *et al.*, 2002; ÖLMEZ *et al.*, 2003; VACHIRAROJPISAN *et al.*, 2004; ERSIN *et al.*, 2006). Esses resultados parecem ser independentes da técnica de coleta da amostra: saliva não estimulada (FUJIWARA *et al.*, 1991; RAMOS-GOMEZ *et al.*, 2002; ÖLMEZ *et al.*, 2003; ERSIN *et al.*, 2006); saliva estimulada por parafina (GRANATH *et al.*, 1992; VACHIRAROJPISAN *et al.*, 2004); impressão da língua (MATTE *et al.*, 1992; O'SULLIVAN E TINANOFF, 1993; DOUGLASS *et al.*, 1996; THIBODEAU E O'SULLIVAN, 1996, 1999; MATTOS-GRANER *et al.*, 1998, 2001; MILGRON *et al.*, 2000; PETTI *et al.*, 2000) ou placa bacteriana (HALLOSTEN *et al.*, 1995; NOBRE DOS SANTOS *et al.*, 2002). Tem sido demonstrada boa correlação entre colonização de EGM na placa e os níveis desses microorganismos na saliva estimulada (Van HOUTE, 1993).

No presente estudo, EGM foi detectado em 57,5% das crianças. Esses dados se assemelham aos valores encontrados em Hallostén *et al.* (1995) na Suécia, onde 67% das crianças de 18 meses de idade se encontraram contaminadas por EGM. Ramos-Gomez *et al.* (2002) nos Estados Unidos, reportaram níveis de contaminação da ordem de 59% em crianças de 3 a 55 meses de idade. Mais recentemente, Ersin *et al.* (2006), na Turquia, verificaram que 49% das crianças de 15 a 35 meses de idade apresentavam níveis detectáveis de EGM. Esta prevalência é maior do que a encontrada em algumas pesquisas. Em estudo na Finlândia, EGM foram isolados em 38% das crianças (ALALUUSUA; RENKONEN, 1983); no Japão, em 39,9% (FUJIWARA *et al.*, 1991); na Suécia, em 6,3 e 28% em crianças com 1 e 2,5 anos de idade, respectivamente (GRINDEFJORD *et al.*, 1993). Em 2006, foram reportados níveis de contaminação em 20% das crianças avaliadas (BANKEL *et al.*); e na Inglaterra em 37,44% em crianças afro-caribenhas e caucasianas com idades de 3 e 4 anos (ZOITOPoulos *et al.*, 1996).

Nos Estados Unidos, no entanto, Thibodeua *et al.* (1993) isolaram EGM em 83% das amostras de saliva de crianças de 2 a 5 anos de idade; enquanto na China, Li *et al.* (1994) encontraram em 94,7% das crianças de 3 a 4 anos de idade; no Brasil, Mattos-Graner *et al.* (1998, 1998a) detectaram em 80,3% das crianças entre 1 a 2,5 anos de idade. Ölmez *et al.* (2003) estudando crianças turcas da zona rural, na faixa etária de 9 a 57 meses de idade, encontraram 100% de contaminação. Essas diferenças podem ser explicadas pelas diversas metodologias utilizadas para coleta de saliva e cultura de EGM.

Apenas uma criança (1 ano e 5 meses) do presente estudo se encontrava em fase pré-dental, não sendo nela detectada a presença do EGM, dado esse previamente confirmado (FUJIWARA *et al.*, 1991). Outros trabalhos, no entanto, relatam a presença de EGM na saliva de crianças em fase pré-dental (MILGROM *et al.*, 2000; RAMOS-GOMEZ *et al.*, 2002), sendo considerado o principal fator para a ocorrência da contaminação por EGM o aumento na frequência de consumo de açúcar, seguido pela amamentação de forma incorreta e hábitos que podem transferir saliva da mãe para o bebê (WAN *et al.*, 2001).

Outro achado de importância no presente estudo foi a detecção de EGM, quando pelo menos quatro incisivos haviam erupcionado, e lesões de cárie só vieram a surgir quando os quatro primeiros molares estavam presentes; isto também foi encontrado por Fujiwara *et al.* (1991). Estes achados sugerem que à medida que aumenta o número de superfícies dentárias, crescem os níveis de EGM na saliva. A correlação positiva entre idade, dentes erupcionados e contaminação por EGM também foi observada por Milgron *et al.* (2000); Mattos-Graner *et al.* (2001); Ölmez *et al.* (2003) e Vachirarojpisan *et al.* (2004). Entre as 15 crianças que só tinham erupcionado os incisivos, um terço das crianças estavam contaminadas. Achado semelhante foi encontrado por Mattos-Graner *et al.* em 2001 (50%). Os fatores associados com a colonização de EGM em crianças dentadas são: ir para cama com mamadeira contendo bebidas adoçadas, consumo frequente de açúcares e lanchinhos, compartilhar a refeição com um adulto e níveis maternos elevados de EGM. Por outro lado, a não-colonização por EGM está associada a escovação e uso de antibióticos (WAN *et al.*, 2003).

Crianças sem cárie, mas com altos níveis de EGM (28,95%), também foram encontradas em outros estudos (CARLSSON *et al.*, 1987; CHOSACK *et al.*, 1988; HOLBROOK *et al.*, 1989; MATTE *et al.*, 1992; MATTOS-GRANER *et al.*, 1998, 1998a), demonstrando que EGM pode estar difundido na população humana com baixa experiência de cárie e, conseqüentemente, que essas bactérias podem estar presentes sem associação com cárie, como resultado de um estilo de vida (CARLSSON *et al.*, 1987). Outros estudos, entretanto, encontraram baixos níveis de EGM em crianças sem cárie (HALLOSTEN *et al.*, 1995) e baixos níveis de EGM em crianças muito jovens com cárie (RAMOS-GOMEZ *et al.*, 2002). Essa variabilidade de resultados pode ser explicada pela dificuldade em se obter amostras de saliva estimulada em crianças jovens (RAMOS-GOMEZ *et al.*, 2002).

Vários estudos indicam que o estabelecimento precoce de EGM na cavidade bucal está associado com o início da doença cárie em crianças jovens (FUJIWARA *et al.*, 1991; MATTOS-GRANER *et al.*, 1998; ÖLMEZ *et al.*, 2003). Crianças sem cárie, mas altamente contaminadas por EGM no 1º ano de vida, mostram maior prevalência de cárie no 2º ano de vida (FUJIWARA *et al.*, 1991). Crianças que se contaminam com mais de 2 anos de idade, contudo, apresentam menor experiência de cárie (CAUFIELD *et al.*, 1993; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001). A presença de EGM está fortemente relacionada ao consumo de bebidas adoçadas à noite e ao consumo diário total de bebidas adoçadas. Assim, o padrão de comportamento materno influenciando os hábitos dietéticos pode predispor a colonização precoce de EGM (GRINDEFJORD *et al.*, 1991). Se, no entanto, uma criança aos 3 anos de idade estiver com altos níveis de EGM, isso pode ser considerado fator de risco à cárie na dentição permanente, principalmente cárie de fôssulas e fissuras (THIBODEAU; O’SULLIVAN, 1999).

A correlação positiva entre experiência de cárie e contaminação por EGM vista nesta pesquisa foi também observada em outros estudos (FUJIWARA *et al.*, 1991; HALLOSTEN *et al.*, 1995; DOUGLASS *et al.*, 1996; THIBODEUA *et al.*, 1993; THIBODEAU; O’SULLIVAN, 1996, 1999; MATTOS-GRANER *et al.*, 1998, 1998a; MILGRON *et al.*, 2000; RAMOS-GOMEZ *et al.*, 2002; BANKEL *et al.*, 2006; ERSIN *et al.*, 2006). A contaminação por EGM aumentou com a idade numa correlação positiva. Esse achado também foi encontrado nas pesquisas de Fujiwara *et al.*, 1991; Milgron *et al.*, 2000; Ramos-Gomez *et al.*, 2002; Ölmez *et al.*, 2003.

Cinco crianças saudáveis e 12 crianças desnutridas apresentaram experiência de cárie, mas não estavam contaminadas por EGM. Para Beighton (2005), o papel essencial dos EGM no processo de cárie não está comprovado. A produção de ácido pela placa dental não é dependente da presença dessas bactérias. Cárie dentária ocorre na ausência dessas bactérias e a presença delas não indica necessariamente atividade de cárie. Outras bactérias orais são acidogênicas e acidúricas, e elas superam em número os EGM na placa dental, havendo dados que suportam a função dessas bactérias no início e progressão da cárie dental. EGM são bons marcadores da doença, mas não necessariamente agentes etiológicos da doença. Entendendo a cárie como uma consequência da interação de muitos fatores, está reconhecido que o início da cárie, na ausência ou presença de EGM, pode ser explicado pela relação dinâmica e positiva entre os fatores: consumo de carboidrato, composição da flora da placa, potencial acidogênico da placa e atividade de cárie (BEIGHTON, 2005).

Não foi encontrada relação entre os diferentes graus de desnutrição e S-CPI, bem como não foi achada diferença significativa entre a contaminação por EGM e S-CPI. Esse dado não foi descrito por Mattos-Graner *et al.* (1998a), que observaram associação positiva entre os níveis de EGM e a severidade da cárie dental. Dois hábitos de higiene oral estão relacionados a S-CPI: escovação não supervisionada pelos pais e uso de grande quantidade de creme dental durante a escovação; bem como doença na infância e uso de medicação adoçada (HALLETT; O’ROURKE, 2006).

Apesar de infecção por EGM e de padrão alimentar inadequado serem necessários, eles não são suficientes para iniciar a CPI. Algumas crianças desenvolvem a doença e outras não, e isso deve estar relacionado às diferenças entre quantidade e qualidade da saliva dessas crianças, fatores genéticos e hipoplasia linear de esmalte, entre outros fatores (FARIAS; BEZERRA, 2003). Alguns estudos apontam forte correlação entre hipoplasia de esmalte, cárie e contaminação por EGM (LI *et al.*, 1994; MILGRON *et al.*, 2000). Hipoplasia de esmalte pode predispor um dente ao desenvolvimento de cárie se o hospedeiro (criança) adquire a bactéria cariogênica e consome uma dieta altamente cariogênica (SEOW, 1998). Os mecanismos sinérgicos entre desnutrição e infecção, que se pensa serem responsáveis pela ocorrência de hipoplasia linear do esmalte em dentes anteriores, também pode predispor a um maior risco de cárie nos dentes posteriores (INFANTE; GILLESPIE, 1977).

Neste estudo, hipoplasia de esmalte foi um achado raro, com manifestação em apenas três crianças, e apenas uma teve experiência de cárie, o que difere dos estudos de Sweeney *et al.* (1971); Infante e Gillespie (1976, 1977); Johansson *et al.* (1992) e Li *et al.* (1996), ao sugerirem que a presença de hipoplasia de esmalte predispõe ao aparecimento de cárie em crianças desnutridas. Quanto à contaminação por EGM, uma não teve EGM detectado e duas tiveram EGM em contagens moderadas, no entanto, Li *et al.* (1994) encontraram significativa associação entre a presença de hipoplasia de esmalte e altas contagens de EGM, sugerindo que as irregularidades da superfície do esmalte podem ser fator de contribuição que fomenta o aumento da colonização de EGM na boca de crianças.

Os resultados encontrados na atual pesquisa podem ser decorrentes da baixa renda familiar e do nível educacional materno, como relatado em Ramos-Gomez *et al.* (2002); Vachirarojpisan *et al.* (2004) e por Ersin *et al.* (2006). Renda familiar baixa pode comprometer a seleção dos alimentos e nutrientes ingeridos pelas mães e crianças durante o desenvolvimento dentário. Outros fatores de importância são o grau de educação, a importância dos cuidados de saúde e o acesso às informações sobre cuidados de saúde e o estilo de vida. Como consequência, renda familiar pode ser um fator indireto para a suscetibilidade dentária à cárie (LI *et al.*, 1996).

Há poucos estudos sobre a composição salivar em crianças (SEVENHUYSEN *et al.*, 1984; BEN-ARYEH *et al.*, 1984, 1990; TENOVUO *et al.*, 1986, 1987; HYYPPÄ *et al.*, 1989; KARGÜL *et al.*, 1994; DEZAN *et al.*, 2002; FARIAS; BEZERRA, 2003; RUHL *et al.*, 2005), principalmente quando realizado em crianças desnutridas (MCMURRAY *et al.*, 1977; IBRAHIM *et al.*, 1978; AGARWAL *et al.*, 1984; AZZOPARDI; WATSON, 1986; JOHANSSON *et al.*, 1992, 1994). Nesta pesquisa, procurou-se estudar a relação da concentração de proteína total na saliva de crianças desnutridas em seus diferentes estados nutricionais e a presença de CPI. Vários fatores fisiológicos são capazes de influenciar a composição da amostra de saliva total. Entre eles estão a fonte de saliva, o método de coleta e o grau de estimulação. Foi decidido estudar a saliva não estimulada das crianças, em razão da dificuldade de padronizar a estimulação em crianças tão jovens, e porque os componentes salivares mudam com o tipo e

duração do estímulo (KARGÜL *et al.*, 1994). O uso de um coletor plástico, no entanto, pode levar a uma pequena estimulação do fluxo salivar, porque as crianças pequenas movimentam os lábios, procurando sugar o coletor (DEZAN *et al.*, 2002).

Observou-se no presente trabalho que o tempo de coleta de saliva foi maior nas crianças desnutridas, por estas apresentarem fluxo salivar diminuído, dado este não previamente relatado em Johansson *et al.* (1992, 1994), que não observaram redução do fluxo salivar não estimulado em crianças indianas com DEP. Ademais, a grande variabilidade de valores encontrados nos testes bioquímicos em crianças da mesma faixa etária foi previamente relatada por Ben-Aryeh *et al.* (1984); Hyypä *et al.* (1989) e Farias e Bezerra (2003). Este fato pode ser relacionado à maturação do sistema imunológico, que varia entre os indivíduos (BEN-ARYEH *et al.*, 1984; FARIAS; BEZERRA, 2003). Já Ruhl *et al.* (2005) encontraram uma constância na concentração média de proteínas durante o primeiro ano de vida. A composição salivar não recebe influência da erupção dentária (BEN-ARYEH *et al.*, 1984; HYYPPÄ *et al.*, 1989; RUHL *et al.*, 2005), nem da introdução de alimentos sólidos (BEN-ARYEH *et al.*, 1984).

No corrente estudo, não se observou correlação entre CPT e experiência de cárie, conforme previamente descrito em outros estudos (BEN-ARYEH *et al.*, 1984; TENOVUO *et al.*, 1987; KARGÜL *et al.*, 1994; FARIAS; BEZERRA, 2003). A CPT aumentou linearmente com a idade, como relatado por Ben-Aryeh *et al.* (1990); Tenovuo *et al.* (1987) e Kargül *et al.*, 1994. Ben-Aryeh *et al.* (1984); Tenovuo *et al.* (1986) e Hyypä *et al.* (1989) observaram que CPT era alta ao nascimento, sendo objeto de redução com a idade no 1º ano de vida; e Dezan *et al.* (2002) não encontraram diferença significativa entre as idades estudadas. Não houve diferença entre os sexos quanto à dosagem total de proteína, achado semelhante ao encontrado por Ben-Aryeh *et al.* (1984, 1990); Tenovuo *et al.* (1986) e Dezan *et al.* (2002). Em acréscimo, no presente trabalho não se observou correlação entre CPT e contagens de EGM em saliva, dado este nunca anteriormente investigado na literatura.

Quando a CPT entre os diferentes graus de desnutrição são comparados entre si, pode-se observar que os valores encontrados no GI e no GII não diferiam entre si, mas quando esses são comparados com o GIII, uma menor CPT foi observada. Ao comparar as crianças desnutridas com as saudáveis, observou-se diferença entre GI e GII e as crianças saudáveis. Crianças gravemente desnutridas, entretanto, apresentaram níveis de CPT semelhantes aos das crianças saudáveis. McMurray *et al.* (1977) encontraram concentrações semelhantes entre os diferentes graus analisados. Bem assim, Johansson *et al.* (1994), que não observaram diferença nem entre os grupos de desnutrição nem ao compará-los com o grupo-controle, contudo utilizaram saliva estimulada para esta análise. No GIII, entretanto, o aumento dos componentes protéicos pode ser decorrente da degeneração tecidual das crianças severamente desnutridas (EL-SHOBAKI *et al.*, 1977). Agarwal *et al.* (1984) encontraram diminuição progressiva nas proteínas salivares à medida que aumentava o grau de desnutrição. Isto pode derivar do fato de a DEP, particularmente do tipo Kwashiorkor, apresentar um estágio de hipoaminoacidemia

(SAID *et al.*, 1974). A DEP, nessa fase afeta a síntese de proteína, levando a uma redução desta como resultado da restrição da síntese protéica (EL-SHOBAKI *et al.*, 1977; IBRAHIM *et al.*, 1978). Ibrahim *et al.* (1978), no entanto, encontraram aumento significativo na CPT nos casos edematosos, mas não nos casos não edematosos. Os autores relacionaram este fato como sendo um processo de adaptação da criança marasmática com a escassez da dieta, ajudando-a a escapar da complicação; tendo-se concluído que a elevação dos constituintes protéicos nos casos edematosos pode resultar do severo envolvimento glandular, quando comparado aos casos não edematosos, reflexo da diminuição da capacidade funcional glandular. Johansson *et al.* (1994) também observaram reduzida capacidade das glândulas salivares das crianças desnutridas em secretar saliva estimulada e de sintetizar algumas glicoproteínas, aglutininas, lactoferrina e IgA específica anti-EGM.

É difícil comparar o perfil das proteínas salivares em virtude das diferenças existentes na origem da saliva estudada (oriunda exclusivamente das glândulas parótidas e submandibulares, *versus* saliva total humana ou mista), faixa etária dos grupos estudados, métodos de análises etc. As diferenças encontradas nos estudos decorrem principalmente com a não-padronização na coleta das amostras e nos métodos laboratoriais empregados. Técnicas de eletroforese são usadas para analisar componentes protéicos salivares, no entanto um só método não é capaz de fornecer informação adequada de todas as proteínas salivares (KARGÜL *et al.*, 1994). Neste estudo, proteínas salivares foram analisadas pelo método de eletroforese descrito por Laemmli (1970), e procurou-se observar se houve diferença no perfil protéico entre crianças saudáveis e crianças desnutridas, quanto à experiência de cárie e contaminação por EGM.

Em relação à experiência de cárie, não foram observadas diferenças entre os grupos GN, GI e GII, seja na ausência ou presença de cárie, no entanto, o grupo GIII apresentou banda protéica que surgiu exclusivamente na presença de cárie dentária. Kargül *et al.* (1994), examinando crianças saudáveis de 3 a 13 anos de idade, e Farias e Bezerra (2003), examinando crianças saudáveis de 12 a 47 meses de idade, também não encontraram diferenças nos parâmetros investigados quanto à experiência de cárie. Tenovuo *et al.* (1987) não encontraram correlação entre os fatores antimicrobianos salivares investigados e experiência de cárie (CPO-S), mas isto só foi observado nos adultos estudados porque o grupo das crianças não apresentou lesões de cárie, por serem bem jovens. Não há uma intensa relação entre um fator salivar (exceto fluxo salivar) e prevalência de cárie. Os fatores de defesa estão simultaneamente presentes na saliva e podem interagir de várias maneiras. Suas concentrações, todavia, são reguladas pelo fluxo salivar, logo, uma redução do fluxo salivar pode resultar na redução da capacidade dos fatores de defesa, bem como ensejar um aumento na suscetibilidade às doenças orais (TENOVUO *et al.*, 1987).

Nas crianças saudáveis e nas crianças desnutridas dos grupos leve e moderado, não foram encontradas diferenças na presença de bandas protéicas quanto à contaminação por EGM ou não; mas foi vista diferença nas crianças desnutridas. O sistema salivar antimicrobiano não imunológico afeta a aderência, agregação metabolismo e multiplicação dos microorganismos

orais, e pode ser visto na saliva de crianças em níveis semelhantes aos dos adultos quando os dentes decíduos erupcionam (TENOVUO *et al.*, 1986). A atividade de duas proteínas salivares com habilidade de agregar EGM está comprometida nas crianças desnutridas. Assim, a diminuição da capacidade de limpeza de bactérias em combinação com outros efeitos da DEP, como diminuição do fluxo salivar e aumento da solubilidade do esmalte, pode contribuir para o desenvolvimento de cáries em crianças desnutridas (JOHANSSON *et al.*, 1994). Em razão de o sistema de defesa inato possuir muitos fatores com propriedades antimicrobianas, ele proporciona proteção contra microorganismos patogênicos numa época crítica, quando o sistema imunológico está ainda imaturo (TENOVUO *et al.*, 1986). Dessa forma, o sistema salivar não imunológico provavelmente oferece proteção oral contra a infecção primária da bactéria cariogênica, mas a eficácia pode diminuir quando a patologia está realmente estabelecida (FARIAS; BEZERRA, 2003).

As mudanças ocorridas na composição salivar indicam o processo de crescimento e maturação das glândulas salivares, como parte do desenvolvimento geral do sistema orgânico. No início da infância, o desenvolvimento do sistema nervoso autossômico é dominante, e, mais tarde, a maturação dos sistemas imunológicos e hormonais é refletida na composição salivar. Também mudanças na composição sérica, crescimento das glândulas salivares e diferenças antigênica, nutricional e na atitude emocional das crianças, que mudam com a idade, podem ser refletidas na composição salivar (BEN-ARYEH *et al.*, 1990). Os níveis salivares da maioria dos componentes antimicrobianos, porém, não são afetados pela erupção dentária (BEN-ARYEH *et al.*, 1984; HYYPPÄ *et al.*, 1989; RUHL *et al.*, 2005).

A população estudada caracterizou-se por ser de baixa renda, com severas limitações no grau de instrução dos pais das crianças que participaram do estudo. Procurou-se controlar os fatores fisiológicos inerentemente capazes de influenciar qualitativa e quantitativamente os componentes salivares avaliados por meio da padronização no horário e método usado nas coletas de amostras. Dificuldades foram encontradas, associadas à baixa faixa etária da população em questão, bem como ao grau de severidade no comprometimento sistêmico das crianças desnutridas. Neste estudo, todavia, realizou-se trabalho pioneiro de caráter clínico e biomolecular do perfil protéico salivar de crianças com diferentes graus de desnutrição, diferentes perfis de experiência de cárie e grandes variações nos níveis de EGM salivares, podendo-se observar que a desnutrição aumenta o risco à cárie dentária nos graus leve e grave, e que, apesar de a CPT se relacionar ao estado nutricional das crianças, essa variável não foi determinante para a experiência de cárie.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- 1) Crianças desnutridas em graus leve e grave apresentam maior risco à cárie do que as crianças nutridas e as crianças desnutridas em grau moderado, provavelmente em razão de um perfil protéico salivar diferenciado.
- 2) CPT e sexo não são determinantes de experiência de cárie ou severidade da doença; no entanto, idade, contagens de EGM e estado nutricional das crianças se relaciona à experiência e severidade da cárie de primeira infância.
- 3) A contaminação por EGM não diferencia entre crianças nutridas ou desnutridas
- 4) CPT aumenta com a idade e recebe influência do estado nutricional, em que crianças nutridas e crianças desnutridas gravemente apresentam níveis semelhantes de CPT, e crianças desnutridas em graus leve e moderado apresentam redução na CPT.
- 5) CPT não se associa à experiência de cárie, à severidade da doença e aos níveis de EGM em saliva.
- 6) A expressão do perfil protéico salivar assemelha-se entre crianças nutridas e aquelas com desnutrição em graus leve e moderado, independentemente da presença de cárie dentária ou da contaminação por EGM. Crianças gravemente desnutridas com cárie ou contaminadas por EGM apresentam perfil protéico salivar diferenciado.

REFERÊNCIAS

- AAPD: definitions, oral health policies, and clinical guidelines: Policy on early childhood caries (ECC): classifications, consequences, and preventive strategies. Disponível em: <http://www.aapd.org/media/Policies_Guidelines/P_ECCClassification.pdf>. Acesso em: 2 June 2008.
- AGARWAL, P. K.; AGARWAL, K. N.; AGARWAL, D. K. Biochemical changes in saliva of malnourished children. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 39, n.2, p.181-184, 1984.
- ALALUUSUA, S.; MÄTTÖ, J.; GRÖNROOS, L.; INNILÄ, S.; TORKKO, H.; ASIKAINEN, S.; JOUSIMIES-SOMER, H.; SAARELA, M. Oral colonization by more than one clonal type of mutans Streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. **Arch. Oral Biol.**, v. 41, n.2, p.167-173, 1996.
- ALALUUSUA, S.; RENKONEM, O. Streptococcus mutans establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 91, p. 453-7, 1983.
- AL-HASHIMI, I.; LEVINE, M. J. Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. **Arch. Oral Biol.**, v.34, n.4, p. 289-295, 1989.
- ALVAREZ, J. O. Nutrition, tooth development, and dental caries. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 61, p. 410-416, 1995.
- ALVAREZ, J. O.; CACEDA, J.; WOOLLEY, T. W. A longitudinal study of dental caries in the primary teeth of children who suffer from infant malnutrition. **J. Dent. Res.**, v.72, 1p. 573-1576, 1993.
- ALVAREZ, J. O.; EGUREN, J. C.; CACEDA, J.; NAVIA, J. M. The Effect of Nutritional Status on the Age Distribution of Dental Caries in the Primary Teeth. **J. Dent. Res.**, v. 69, n. 9, p. 1564-1566, 1990.
- ALVAREZ, J. O.; LEWIS, C. A.; SAMAN, C.; CACEDA, J.; MONTALVO, J.; FIGUEROA, M. L. Chronic malnutrition, dental caries, and tooth exfoliation in Peruvian children aged 3-9 years. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 48, p. 368-372, 1988.
- ALVAREZ, J. O.; NAVIA, J. M. Nutritional status, tooth eruption, and dental caries: A review. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 49, p. 417-426, 1989 *apud* LI, Y.; NAVIA, J. M.; BIAN, J. Y. Caries experience in deciduous dentition of rural Chinese children 3-5-years-old in relation to the presence or absence of enamel hypoplasia. **Caries Res.**, v. 30, p. 8-15, 1996.

AYHAN, H.; SUSKAN, E.; YILDIRIM, S. The effect of nursing or rampant caries on height, body weight, and head circumference. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v. 20, p. 209-212, 1996.

AZZOPARDI, D.; WATSON, J. G. Gambian children have less salivary secretory immunoglobulin A than British children. **J. Trop. Pediatr.**, v. 32, p. 20-122, 1986.

BANKEL, M.; ERIKSSON, U-C.; RPBERTSON, A.; KÖHLER, B. Caries and associated factors in a group of Swedish children 2-3 years of age. **Swed Dent J**, v. 30, p. 137-146, 2006.

BATISTA FILHO, M. Alimentação, nutrição e saúde. In: ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia & saúde**. 6. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003. cap. 13, p. 389-414.

BAUGHAN, L. W.; ROBERTELLO, F. J.; SARRETT, D. C.; DENNY, P. C. Salivary mucin as related to oral *Streptococcus mutans* in elderly people. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.15, p. 10-14, 2000.

BEDI, G. S. The effect of adrenergic agonists and antagonists on the expression of proteins in rat submandibular and parotid glands. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 4, p. 565-571, 1993.

BEIGHTON, D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 33, p. 248-255, 2005.

BELLAMY, W.; WAKABAYASHI, H.; TAKASE, M.; KAWASE, K.; SHIMAMURA, S.; TOMITA, M. Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 182, n. 2, p. 97-105, 1993.

BEN-ARYEH, H.; FISHER, M.; SZARGEL, R.; LAUFER, D. Composition of whole unstimulated saliva of healthy children: Changes with age. **Arch. Oral Biol.**, v. 35, n. 11, p. 929-931, 1990.

BEN-ARYEH, H.; LAPID, S.; SZARGEL, R.; BENDERLY, A.; GUTMAN, D. Composition of whole unstimulated saliva of human infants. **Arch. Oral Biol.**, v. 29, p. 357-362, 1984.

BERKOWITZ, R. J.; JORDAN, H. V.; WHITE, G. The early establishment of *Streptococcus mutans* in the mouths of infants. **Arch. Oral Biol.**, v. 20, p. 171-174, 1975.

BERKOWITZ, R. J.; TURNER, J.; GREEN, P. Maternal salivary levels of *Streptococcus mutans* and primary oral infection in infants. **Arch. Oral Biol.**, v.26, p.147-49, 1981.

BIKKER, F. J.; LIGTENBERG, A. J. M.; Van der WAL, J. E.; Van der KEIJBUS, P.A.M.; HOLMSKOV, U.; VEERMAN, E. C. I.; NIEW AMEROGEN, A. V. Immunohistochemical Detection of Salivary Agglutinin/gp-340 in Human Parotid, Submandibular, and Labial Salivary Glands. **J. Dent. Res.**, v. 81, n. 2, p. 134-139, 2002.

BOLSCHER, J.G.M.; NAZMI, K.; RAN, L.J.; van ENGELBURG, F.A.C.; SCHUITEMAKER, H.; VEERMAN, E. C. I.; NIEUW AMERONGEN, A.V. Inhibition of HIV-1 IIB and clinical isolates by human parotid, submandibular, sublingual and palatine saliva. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 110, p. 149-156, 2002.

BOUE, D.; ARMAU, E.; TIRABY, G. A bacteriological study of rampant caries in children. **J. Dent. Res.**, v. 66, n. 1, p. 23-28, 1987.

BOWDEN, G. H. Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 25, p. 76-81, 1997.

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

BRETZ, W.A.; DJAHJAH, C.; ALMEIDA, R. S.; HUJOEL, P. P.; LOESCHE, W. J. Relationship of microbial and salivary parameters with dental caries in Brazilian pre-school children. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 20, n. 5, p. 261-264, 1992.

BRUNSER, O.; CARRAZZA, F.; GRACEY, M.; NICHOLS, B., SENTERRE, J. **Nutricion clinica en la infancia**. New Cork: Raven Press, 1985.

CARLÉN, A.; OLSSON, J. Monoclonal antibodies against a high-molecular-weight agglutinin block adherence to experimental pellicles on hydroxyapatite and aggregation of *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res.**, v. 74, n. 4, p. 1040-1047, 1995.

CARLSSON, P.; GANDOUR, I. A.; OLSSON, B.; RICKARDSSON, B.; ABBAS, K. High prevalence of mutans streptococci in a population with extremely low prevalence of dental caries. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 2, p. 121-124, 1987.

CASTRO, P.; TOVAR, J.A.; JARAMILLO, L. Adhesion of *Streptococcus mutans* to salivary proteins in caries-free and caries-susceptible individuals. **Acta Odontol. Latinoam.**, v. 19, n. 2, p. 59-66, 2006.

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

CHOSACK, A.; CLEATON-JONES, P.; WOODS, A.; MATJKA, J. Caries prevalence and severity in the primary dentition and *Streptococcus mutans* levels in the saliva of preschool children in South Africa. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 16, n. 5, p. 289-291, 1988.

CLARKE, J. K. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 5, p. 141-6, 1924.

CLEATON-JONES, P.; RICHARDSON, B. D.; GRANATH, L.; FATTI, L. P.; SINELL, R.; WALKER, A. R.; MOGOTSI, M. Nutritional status and dental caries in a large sample of 4- and 5-year-old South African children. **S. Afr. Med. J.**, v. 90, p. 31-635, 2000.

COLLARES, E. F.; BRASIL, M. do R. L.; KAWAZAKI, S. T. Secreção de saliva, concentração e secreção da amilase salivar humana no primeiro ano de vida. **Arq. Gastroenterol.**, v. 16, n. 2, p. 91-94, 1979.

D'AVILA, E. M. M. Estudo epidemiológico de alguns problemas nutricionais. In GOUVEIA, E. L. C. **Nutrição: saúde & comunidade**. 2. ed. Rio de Janeiro: REVINTER, 1999. cap 1, p. 1-26.

DAWES, C. Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man. **J. Dent. Res.**, v. 66, spec. iss., p. 648-653, 1987.

DENNY, P. C.; DENNY, P. A.; KLAUSER, D. K.; HONG, S. H.; NAVAZESH, M.; TABAK, L.A. Age-related changes in mucins from human whole saliva. **J. Dent. Res.**, v. 70, n. 10, p. 1320-1327, 1991.

DEVINCENZI, M.U.; LESSA, A.C.; SIGULEM, D.M. Nutrição em Saúde Pública. In LOPEZ, F.A.; BRASILL, A.L.D. **Nutrição e dietética em clínica pediátrica**. São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 5, p. 127-137.

DEZAN, C. C.; NICOLAU, J.; SOUZA, D. N.; WALTER, L. R. F. Flow rate, amylase activity, and protein and sialic acid concentrations of saliva from children aged 18, 30 and 42 months attending a baby clinic. **Arch. Oral Biol.**, v. 47, p. 423-427, 2002.

DIAZ-ARNOLD, A. M.; MAREK, C. A. The impact of saliva on patient care: A literature review. **J. Prosthet. Dent.**, v. 88, n. 3, p. 337-343, 2002.

DOUGLAS, C. R. Fisiologia da Secreção Salivar *In*: _____. **Tratado de fisiologia aplicada à nutrição**. São Paulo: Robe Editorial, 2002. cap. 30, p. 489-502.

DOUGLASS, J. M.; O'SULLIVAN, D. M.; TINANOFF, N. Temporal changes in dental caries levels and patterns in a native American preschool population. **J. Public Health Dent.**, v. 56, n. 4, p. 171-175, 1996.

DOUGLAS, W.H.; REEH, E.S.; RAMASUBBU, N.; RAJ, P.A.; BHANDARY, K.K.; LEVINE, M.J. Statherin: a major boundary lubricant of human saliva. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 180, n. 1, p. 91-97, 1991.

DOWD F. J. Saliva and Dental Caries. **Dent. Clin. North Am.**, v. 43, n. 4, p. 79-597, 1999.

DRISCOLL, J.; ZUO, Y.; XU, T.; CHOI, J. R.; TROXLER, R. F.; OPPENHEIM, F. G. Functional comparison of native and recombinant human salivary histatin1. **J. Dent. Res.**, v. 74, n. 12, p. 1837-1844, 1995.

DUNCAN, B. B.; SCHMIDT, M. I.; GIUGLIANI, E. R. J. **Medicina ambulatorial**: condutas de atenção primária baseada em evidências. 3. ed. São Paulo: Artmed, 2004.

EDGAR, W. M. Saliva: Its Secretion, Composition and Functions. **Br. Dent. J.**, v. 172, p. 305-312, 1992.

EDGERTON, M.; KOSHLUKOVA, S. E. Salivary Histatin 5 and its Similarities to the Other Antimicrobial Proteins in Human Saliva. **Adv. Dent. Res.**, v. 14, p. 16-21, 2000.

EL-SHOBAKI, F.A.; IBRAHIM, A.; EL-HAWARY, M.F.S.; SAKR, R.; SAID, A. Salivary amino acids and proteins in normal and malnourished Egyptian infants and young children. **Z. Ernährungswiss**, v. 17, p. 19-25, 1978.

ERSIN, N. K.; ERONAT, N.; CONGULU, D.; UZEL, A.; AKSIT, S. Association of maternal-Child characteristics as a factor in early childhood caries and salivary bacterial counts. **J. Dent. Child.**, v. 73, n. 2, p. 105-111, 2006.

FARIAS, D. G.; BEZERRA, A .C. B. Salivary antibodies, amylase and protein from children with early childhood. **Caries Clin. Oral Invest.**, v. 7, p. 154-157, 2003.

FERGUSON, D. B. Current Diagnostic Uses of Saliva. **J. Dent. Res.**, v. 66, n. 2, p. 420-424, 1987.

FITZGERALD, R. J. Dental caries research in gnotobiotic animals. **Caries Res.**, v. 2, p. 139-146, 1968.

FITZGERALD, R. J.; KEYES, P. H. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. **J. Amer. Dent. Ass.**, v. 61, n.1, p. 9-19, 1960.

FOX, P.C.; Van der VEN, P. F.; SONIES, B. C.; WEIFFENBACH, J. M.; BAUM, B. J. Xerostomia: evaluation of a symptom with increasing significance. **JADA**, v. 110, p. 519-525, 1985.

FUJIWARA, T.; SASADA, E.; MIMA, N.; OOSHIMA, T. Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2-year-old children of Japan. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 19, n. 3, p. 151-154, 1991.

GIBBONS, R. J.; HAY, D. I. Adsorbed Salivary Acidic Proline-rich Proteins Contribute to the Adhesion of *Streptococcus mutans* JTB to Apatitic Surfaces. **J. Dent. Res.**, v. 68, n. 9, p. 1303-1307, 1989.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral Biol.**, v. 18, n. 2, p. 1357-64, 1973.

GRANATH, L.; CLEATON-JONES, P.; FATTI, P. GROSSMAN, E. S. Prevalence of dental caries in 4- to 5-year-old children partly explained by presence of salivary Mutans Streptococci. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 1, p. 66-70, 1993.

GRINDEFJORD, M.; DAHLÖF, G.; WIKNER, S.; HÖJER, B.; MODÉER, T. Prevalence of mutans streptococci in one-year-old children. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 6, p. 280-283, 1991.

HALLETT, K. B.; O'ROURKE, P. K. Pattern and severity of early childhood caries. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 34, p. 25-35, 2006.

HALLONSTEN, A. L.; WENDT, L. K.; MEJÅRE, I.; BIRKHED, D.; HAKANSSON, C.; LINDVALL, A. M.; EDWARDSSON, S.; KOCH, G. Dental caries and prolonged breast-feeding in 18-month-old Swedish children. **Int. J. Paediatr. Dent.**, v. 5, p. 149-155, 1995.

HARRIS, R.; NICOLL, A. D.; ADAIR, P. M.; PINE, C. M. Risk factors for dental caries in young children: a systematic review of the literature. **Community Dent. Health**, v. 21, n. 1 suppl., p. 71-85, Mar. 2004.

HOEK, G. H.; BRAND, H. S.; VEERMAN, E. C. I.; NIEUW AMERONGEN, A. V. Toothbrushing affects the protein composition of whole saliva. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 110, p. 480-481, 2002.

HOLBROOK, W. P.; ÁRNADÓTTIR, I. B.; TAKAZOE, I.; BIRKHED, D.; FROSTELL, G. Longitudinal study of caries, cariogenic bacteria and diet in children just before and after starting school. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 103, p. 42-45, 1995.

HOLBROOK, W. P.; KRISTINSSON, M. J.; GUNNARSDÓTTIR, S.; BRIEM, B. Caries prevalence, Streptococcus mutans and sugar intake among 4-year-old urban children in Iceland. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 17, n. 6, p. 292-295, 1989.

HYYPÄ, T.; KARHUVAARA, L.; TENOVUO, J.; LUMIKARI, M.; VILJA, P. Antimicrobial factors in whole saliva of human infants: a longitudinal study. **Pediatr. Dent.**, v. 11, n. 1, p. 30-36, 1989.

IBRAHIM, A. M.; EL-HAWARY, M. F.; SAKR, R. Protein-calorie malnutrition (PCM) in Egypt immunological changes of salivary protein in PCM. **Z. Ernährungswiss.**, v. 17, n. 3, p. 145-52, 1978.

INFANTE, P. F.; GILLESPIE, G. M. Dental caries experience in the deciduous dentition of rural Guatemalan children ages 6 months to 7 years. **J. Dent. Res.**, v. 55, p. 951-957, 1976.

INFANTE, P. F.; GILLESPIE, G. M. Enamel Hypoplasia in Relation to Caries in Guatemalan Children. **J. Dent. Res.**, v. 56, n. 5, p. 493-498, 1977.

JOHANSSON, I.; LENANDER-LUMIKARI, M.; SAELSTRÖM, A.-K. Saliva Composition in Indian children with Chronic Protein-Energy Malnutrition. **J. Dent. Res.**, v. 73, n. 1, p. 11-19, 1994.

JOHANSSON, I.; SAELSTRÖM, A.-K.; RAJAN, B. P.; PARAMESWARAN, A. Salivary flow and dental caries in Indian children suffering from chronic malnutrition. **Caries Res.**, v. 26, p. 38-43, 1992.

JOHANSSON, M.; LEVINE, M. J.; NANCOLLAS, G. H. Hydroxyapatite Binding Domains in Salivary Proteins. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 4, p. 371-378, 1993.

KARGÜL, B.; YARAT, A.; TANBOGA, I.; EMEKLI, N. Salivary protein and some inorganic element levels in healthy children and their relationship to caries. **J. Marmara Univ. Dent. Fac.**, v. 2, n. 1, p. 434-440, Sept. 1994.

KEYES, P. H. Recent advances in dental caries research. bacteriological findings and biological implications. **Int. Dent. J.**, v. 12, n. 4, p. 443-464, 1962.

KEYES, P. H. Research in dental caries. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 76, p. 1356-1373, 1968.

KEYES, P. H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. **Arch. Oral Biol.**, v. 1, p. 304-320, 1960.

KLOCH, B.; KRASSE, B. A comparison between different methods for prediction of caries activity. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 87, p. 129-39, 1979.

KOUSVELARI, E. E.; CIARDI, J. E.; BOWERS, M. B. Altered bacterial aggregation and adherence associated with changes in rat parotid-gland salivary proteins induced *in vivo* by β -adrenergic stimulation. **Arch. Oral Biol.**, v. 33, n. 5, p. 341-346, 1988.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 27, p. 680-685, 1970.

LAGERLÖF, F.; OLIVERBY, A. Caries-protective factors in saliva. **Adv. Dent. Res.**, v. 8, n. 2, p. 229-238, 1994.

LAJOLO, F. M.; TIRAPEGUI, J. proteínas e Aminoácidos. *In*: DUTRA-DE-OLIVEIRA, MARCHINI, J. S. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 2003. cap. 3, p. 41-68.

LAMKIN, M. S.; ARANCILLO, A. A.; OPPENHEIM, F. G. Temporal and compositional characteristics of salivary protein adsorption to hidroxyapatite. **J. Dent. Res.**, v. 75, n. 2, p. 803-808, 1996.

LARSEN, M. J. Desmineralization of human enamel. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 82, p. 491-495, 1974.

LASSITER, M. O.; NEWSOME, A. L.; SAMS, L. D.; ARNOLD, R. Characterization of Lactoferrin Interaction with Streptococcus mutans. **J. Dent. Res.**, v. 66, n. 2, p. 480-485, 1987.

LENANDER-LUMIKARI, M.; LOIMARANTA, V. Saliva and dental caries. **Adv. Dent. Res.**, v. 14, p. 40-47, 2000.

LENDENMANN, U.; GROGAN, J.; OPPENHEIM, F.G. Saliva and dental pellicle: a review. **Adv. Dent. Res.**, v. 14, p. 22-28, 2000.

LEVINE, M. J.; HERZBERG, M. C.; LEVINE, M. S.; ELISSON, S. A.; STINSON, M. W.; LI, H. C.; VAN DYKE, T. Specificity of salivary-bacterial interactions: role of terminal sialic acid residues in the interaction of salivary glycoproteins with *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. **Infect. Immunol.**, v. 19, p. 107-115, 1978.

LI, Y.; NAVIA, J. M.; BIAN, J. Y. Caries experience in deciduous dentition of rural Chinese children 3-5-years-old in relation to the presence or absence of enamel hypoplasia. **Caries Res.**, v. 30, p. 8-15, 1996.

LI, Y.; NAVIA, J. M.; CAUFIELD, P. W. Colonization by mutans streptococci in the mouths of 3- and 4-year-old Chinese children with or without enamel hypoplasia. **Archs oral Biol.**, v. 39, n.12, p.1057-1062, 1994.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. **Microbiol. Rev.**, v. 50, n. 4, p. 353-380, 1986.

LOW, W.; TAN, S.; SCHWARTZ, S. The effect of severe caries on the quality of life in young children. **Pediatr. Dent.**, v. 21, p. 325-326, 1999.

LUMIKARI, M.; SOUKKA, T.; NURMIO, S.; TENOVUO, J. Inhibition of the growth of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus casei* by oral peroxidase systems in human saliva. **Arch. Oral Biol.**, v. 36, n. 2, p. 155-160, 1991.

MANDEL, I. D. The Functions of saliva. **J. Dent. Res.**, v. 66, suppl., p. 623-627, 1987.

MATEE, M. I. N.; MIKX, F. H. M.; MASELLE, S. Y. M.; HELDERMAN, V. P. W. H. Mutans streptococci and lactobacilli in Breast-fed children with rampant caries. **Caries Res.**, v. 26, p. 183-187, 1992.

MATTOS-GRANER, R. O.; CORRÊA, M. S. N. P.; LATORRE, M. R. O.; PERES, R. C. R.; MAYER, M. P. A. Mutans Streptococci oral colonization in 12-30-month-old-brazilian children over a one-year follow-up period. **J. Public Health Dent.**, v. 61, n. 3, p. 161-167, 2001.

MATTOS-GRANER, R. O.; ZELANTE, F.; LINE, R. C. S. R.; MAYER, M. P. A. Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-year-old Barzilian children. **Caries Res.**, v. 32, p. 319-323, 1998b.

MATTOS-GRANER, R. O.; ZELANTE, F.; PEREZ, R. C. S. R.; MAYER, M. P. A. Prevalência de estreptococos do grupo mutans em crianças de 12 a 31 meses de idade e sua associação com

a frequência e severidade da cárie dental. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v. 12, n. 4, p. 309-314, 1998a.

McDONALD, R.E.; AVERY, D.R. Alterações Congênitas e Adquiridas dos Dentes e Estruturas Orais Associadas. *In*: _____. **Odontopediatria**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. cap. 4, p. 52-53.

McMURRAY, D. N.; REY, H.; CASAZZA, L. J.; WATSON, R. R. Effect of moderate malnutrition on concentrations of immunoglobulins and enzymes in tears and saliva of young Colombian children. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 30, p. 1944-1948, 1977.

MILGROM, P.; RIEDY, C. A.; WEINSTEIN, P.; TANNER, A. C. R.; MANIBUSAN, L.; BRUSS, J. Dental caries and its relationship to bacterial infection, hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6-to-36-month-old children. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 28, p. 295-306, 2000.

MORENO, E. C.; KRESAK, M.; HAY, D. I. Adsorption of two human parotid macromolecules on hydroxy-, fluorhydroxy- and fluorapatites. **Arch. Oral Biol.**, v. 23, n. 7, p. 525-533, 1978.

MURRAY, P. A.; LEVINE, M. J.; TABAK, L. A.; REDDY, M. S. Specificity of salivary-bacterial interactions: II. Evidence for a lectin on *Streptococcus sanguis* with specificity for a NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc sequence. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 106, n. 2, p. 390-396, 1982.

NOBRE DOS SANTOS, M.; MELO DOS SANTOS, L.; FRANCISCO, S. B.; CURY, J. A. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. **Caries Res.**, v. 36, p. 347-352, 2002.

ÖLMEZ, S.; UZAMIS, M.; ERDEM, G. Association between early childhood caries and clinical, microbiological, oral hygiene and dietary variables in rural Turkish children. **Turkish J. Pediatr.**, v. 45, p. 231-236, 2003.

ØRSTAVIK, D.; FREDERICK, W. K. The acquired pellicle: Immunofluorescent demonstration of specific proteins. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 2, n. 1, p. 68, 1973.

O'SULLIVAN, D. M.; TINANOFF, N. Social and biological factors contributing to caries of the maxillary anterior teeth. **Pediatr. Dent.**, v. 15, n. 1, p. 41-44, 1993.

PERESSINI, S.; LEAKE, J. L.; MAYHALL, J. T.; MAAR, M.; TRUDEAU, R. Prevalence of early childhood caries among First Nations children, District of Manitoulin, Ontario. **Int. J. Paediatr. Dent.**, v. 14, p. 101-110, 2004.

PERNETTA, C. **Alimentação da criança**. 7. ed. São Paulo: Fundo Editorial Byk-Prociencx, 1979.

PETTI, S.; CAIRELLA, G.; TARSITANI, G. Rampant early childhood dental decay: an example from Italy. **J. Public Health Dent.**, v. 60, n. 3, p. 159-166, 2000.

PSOTER, W. J.; REID, B. C.; KATZ, R. V. Malnutrition and dental caries: a review of the literature. **Caries Res.**, v. 39, p. 441-447, 2005.

RAMOS-GOMEZ, F. J.; WEINTRAUB, J. A.; GANSKY, S. A.; HOOVER, C. I.; FEATHERSTONE, J. D. B. Bacterial, behavioral and environmental factors associated with early childhood caries. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v. 26, n. 2, p. 165-173, 2002.

REDDY, V.; RAGHRAMULU, N.; BHASKARAM, C. Secretory IgA in protein-calorie malnutrition. **Arch. Dis. Child**, v. 51, n. 11, p. 871-4, 1976.

RICHARDSON, C. F.; JOHNSON, M.; RAJ, P. A.; LEVINE, M. J.; NANCOLLAS, G. H. The influence of histatin-5 fragments on the mineralization of hydroxyapatite. **Arch. Oral Biol.**, v. 38, n. 11, p. 997-1002, 1993.

RUDNEY, J. D. Saliva and dental plaque. **Adv. Dent. Res.**, v. 14, p. 29-39, 2000.

RUHL, S.; RAYMENT, S.A.; SCMALZ, G.; HILLER, K.-A.; TROXLER, R.F. F. Proteins in whole saliva during the first year of infancy. **J. Dent. Res.**, v. 84, n. 1, p. 29-34, 2005.

RUOFF, K. L.; WHILEY, R. A.; BEIGHTON, D. Streptococcus. *In*: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 8th ed. Washington, D.C.: Asm Press, 2003. v.1, p. 405-421.

RUSSELL, M. W.; HAJISHENGALLIS, G.; CHILDERS, N. K.; MICHALEK, S. M. Secretory immunity in defense against cariogenic mutans Streptococci. **Caries Res.**, v. 33, p. 4-15, 1999.

SAID, A.; EL-HAWARY, M. F. S.; EL-SHOBAKI, R. **Gaz. Egypt. Ped. Assoc.**, v. 22, n. 4, 1974 *apud* IBRAHIM, A. M.; EL-HAWARY, M. F.; SAKR, R. Protein-calorie malnutrition (PCM) in Egypt immunological changes of salivary protein in PCM. **Z. Ernährungswiss**, v. 17, n. 3, p. 145-52, 1978.

SAUVE, R. S.; GEGGIE, J. H. Growth and dietary status of pre-dental and term infants during the first two years life. **Can. J. Public Health**, v. 82, p. 95-100 *apud* WAN, A. K. L.; SEOW,

W. K.; PURDIE, D. M.; BIRD, P. S.; WALSH, L. J.; TUDEHOPE, D. I.: A Longitudinal Study of *Streptococcus mutans* Colonization in Infants after Tooth Eruption. **J. Dent. Res.**, v. 82, n. 7, p. 504-508, 2003.

SCANNAPIECO, F. A.; TORRES, G. I.; LEVINE, M. J. Salivary Amylase Promotes Adhesion of Oral Streptococci to Hydroxyapatite. **J. Dent. Res.**, v. 74, n. 7, p. 1360-1366, 1995.

SCHWARTZ, S. A one year statistical analysis of dental emergencies in a pediatric hospital. **J. Can. Dent. Assoc.**, v. 60, p. 959-968, 1994.

SCHWARTZ, S. S.; ZHU, W. X.; SREEBNEY, L. M. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of human whole saliva. **Arch. Oral Biol.**, v. 40, n. 10, p. 949-958, 1995.

SEAL, A.; KERAC, M. Operational implications of using 2006 World Health Organization growth standards in nutrition programmes: secondary data analysis. **BMJ**, p. 1-6, 2007. Disponível em: <<http://www.bml.com>>. Acesso em: 1 June 2008.

SEOW, W. K. Biological mechanisms of early childhood caries. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 26, p. 8-27, 1998.

SEOW, W. K.; AMARATUNGE, A.; BENNETT, R.; BRONSCH, D.; LAI, P. Y. Dental health of Aboriginal pre-school children in Brisbane, Australia. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 24, n. 3, p. 187, 1996.

SEVENHUYSEN, G. P.; HOLONDINSKY, C.; DAWES, C. Development of salivary α -amilase in infants from birth to 5 months. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 39, p. 584- 588, 1984.

SIKORSKA, M. H. J.; MIELNIK-BLASCZAK, M.; KAPEC, E. The relationship between the levels of SigA, lactoferrin and α_{1p} roteinase inhibitor in saliva and permanent dentition caries in 15-year-olds. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 17, p. 272-276, 2002.

SIMMONDS, R. S.; TOMPIKINS, G. R.; GEORGE, R. J. Dental caries and the microbial ecology of dental plaque: a review of recent advances. **New Zealand Dent. J.**, v. 96, p. 44-49, 2000.

SELWITZ, R.; ISMAIL, A.; PITTS, N. **Dental caries**. Disponível em:<<http://www.thelancet.com/vol369/p.51-59/2007>>. Acesso em: 4 Jan. 2007.

SWEENEY, E. A.; SAFFIR, A. J.; LEON, R. Linear hypoplasia of deciduous incisor teeth in malnourished children. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 24, p. 29-31, 1971.

TABAK, L. A.; LEVINE, M. J.; JAIN, N. K.; BRYAN, A. R.; COHEN, R. E.; MONTE, L. D.; ZAWACKI, S.; NANCOLLAS, G. H.; SLOMIANY, A.; SLOMIANY, B. L. Adsorption Of human salivary mucins to hydroxyapatite. **Arch. Oral Biol.**, v. 30, n. 5, p. 423-427, 1985.

TENOVUO, J.; GRAHN, E.; LEHTONEN, O.-P.; HYYPPÄ, T.; KARHUVAARA, L.; VILJA, P. Antimicrobial Factors in Saliva: Ontogeny and Relation to Oral Health. **J Dent Res**, v. 66, n. 2, p. 475-479, 1987.

TENOVUO, J.; LAGERLÖF, F. Saliva. *In*: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia clínica**. 2. ed. São Paulo: Santos, 1995. cap. 2, p. 17-43.

TENOVUO, J.; LEHTONEN, O.-P.; AALTONEN, A.S.; VILJA, P.; TUOHIMAA, P. A. Antimicrobial factors in whole saliva of Human Infants. **Infect. Immun.**, v. 51, n. 1, p. 49-53, 1986.

THIBODEAU, E. A.; O'SULLIVAN, D. M. Salivary mutans streptococci and dental caries patterns in pre-school children. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 24, p. 164-198, 1996.

THIBODEAU, E. A.; O'SULLIVAN, D. M. Salivary mutans streptococci and caries development in the primary and mixed dentitions of children. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 27, p. 406-412, 1999.

THIBODEAU, E. A.; O'SULLIVAN, D. M.; TINANOFF, N. Mutans streptococci and caries prevalence in preschool children. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 21, p. 288-291, 1993.

TINANOFF, N.; O'SULLIVAN, D. M. Early childhood caries: overview and recent findings. **Pediatr. Dent.**, v. 19, p. 12-16, 1997.

Van HOUTE, J.; GIBBS, G.; BUTERA, C. Oral flora of children with "Nursing Bottle Caries". **J. Dent. Res.**, v. 61, n. 2, p. 382-385, 1982.

Van HOUTE, J. Microbiological Predictors of Caries Risk. **Adv Dent Res**, v. 7, n. 2, p. 87-96, 1993.

Van NIEUW AMERONGEN, A.; BOLSCHER J. G. M.; VEERMAN, E. C. I. Salivary Proteins: Protective and Diagnostic Value in Cariology? **Caries Res.**, v. 38, p. 247-253, 2004.

VACHIRAROJPISAN, T.; SHINADA, K.; KAWAGUCHI, Y.; LAUNGWECHAKAN, P.; SOMKOTE, T.; DETSOMBOONRAT, P. Early childhood caries in children aged 6-19 months. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 32, p. 133-142, 2004.

WAN, A. K. L.; SEOW, W. K.; PURDIE, D. M.; BIRD, P. S.; WALSH, L. J.; TUDEHOPE, D. I. Oral Colonization of *Streptococcus mutans* in Six-month-old Preeruptive Infants. **J. Dent. Res.**, v. 80, n. 12, p. 2060-2065, 2001.

WAN, A. K. L.; SEOW, W. K.; PURDIE, D. M.; BIRD, P. S.; WALSH, L. J.; TUDEHOPE, D. I. A Longitudinal Study of *Streptococcus mutans* Colonization in Infants after Tooth Eruption. **J. Dent. Res.**, v. 82, n. 7, p. 504-508, 2003.

WESTERGRENN, G.; KRASSE, B. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. **J. Clin. Microb.**, v. 7, p. 82-3, 1978.

WINN Jr, W. C.; ALLEN, S. D.; JANDE, W. M.; KONEMAN, E. W.; PROCOP, G. W.; SCRECKENBERGEN, P. C.; WOODS, G. L. The Gram-Positive Cocci: Part II. In: **Koneman's color atlas and testbook of diagnostic microbiology**. 6th ed. [S.l.]: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p. 674-745

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Multicentre Growth Reference Study Group. WHO child growth standards based on length/height; weight and age. **Acta Paediatr. Suppl.**, v. 450, p. 76-85, Apr. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department of Nutrition for Health and Development. Nutrition for health and development: a global agenda for combating malnutrition. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_NHD_00.6.pdf>. Acesso em : 5 June 2008.

ZICKERT, I.; EMILSON, C. G.; KRASSE, B. Correlation of level and duration of *Streptococcus mutans* infection with incidence of dental caries. **Infect. Immun.**, v. 39, n. 2, p. 982-985, 1983.

ZOITOPOULOS, L.; BRAISSFORD, S. R.; GELBIER, S.; LUDFORD, R. W.; MARCHANT, S. H.; BEIGHTON, D. Dental caries and caries-associated microorganisms in the saliva and plaque of 3- and 4-year-old afro-caribbean and caucasian children in South London. **Arch. Oral Biol.**, v. 41, n. 11, p. 1011-1018, 1996.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre esclarecido

“Análise do perfil de proteínas salivares, experiência de cárie e níveis de estreptococos mutans em população de crianças desnutridas”

Seu filho ou filha está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, ele (a) não deve participar contra vontade própria ou contra a sua vontade. Leia com atenção as informações abaixo, sentindo-se livre para fazer qualquer pergunta que desejar, para que não haja dúvida alguma sobre os procedimentos a serem realizados.

- a) O objetivo da pesquisa é verificar se existe alguma diferença entre a saliva de uma criança desnutrida com cárie e a de outra desnutrida sem cárie.
- b) Durante o estudo você deverá fornecer informação sobre o estado geral de saúde do seu filho ou filha.
- c) A participação neste estudo consistirá de coleta de saliva e de um exame dentário de seu filho ou filha para verificar os dentes presentes na boca e o tipo de cárie que ele (a) possa ter.
- d) Nem a coleta de saliva, nem o exame ocasionarão DOR ao seu filho ou filha.
- e) Duas amostras de saliva serão colhidas conforme segue:
 - A primeira amostra consistirá apenas da coleta da saliva já presente na boca do seu filho ou filha com o uso de uma pequena cânula (semelhante a um canudo) enquanto se encontra em repouso no seu colo.
 - Na segunda amostra, seu filho ou filha terá que mastigar um pequeno pedaço de “chiclete” por um minuto, e a mesma se encontrará ligada a um pedaço de fio dental para evitar que o seu filho ou filha venha a engolir o material. Depois de decorrido o tempo o mesmo será retirado da boca e descartado e a saliva coletada será colocada em um pequeno frasco.
 - Para que seja feita a coleta é preciso que seu filho ou filha, esteja em jejum porvno mínimo 1 hora, e que tenha escovado os dentes uma hora antes da consulta.
- f) Seu filho ou filha **NÃO RECEBERÁ INJEÇÃO** de anestésico local.
- g) Essa pesquisa não oferece riscos ou desconforto ao seu filho ou filha.
- h) A saliva recolhida será analisada para descobrir alguma diferença quando comparada à saliva de outras crianças podendo trazer como benefício um tratamento para cárie no futuro.
- i) A participação neste estudo lhe dá o direito de participar do PROJETO **Assistência Odontológica às Crianças do IPREDE**, onde seu filho ou filha será acompanhado(a) por um aluno estagiário para tratamento das cáries que ele ou ela tiver, e/ou prevenção para evitar novas cáries.

j) Você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação do seu filho ou filha neste estudo no momento que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.

k) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo. A Faculdade de Odontologia, Farmácia e Enfermagem (FFOE) não o identificará por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos (os dados serão publicados somente em revista científica e/ou congressos científicos não identificando o nome de seu filho ou filha).

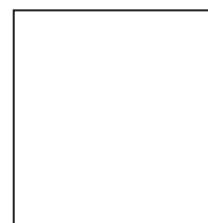
l) O surgimento de resfriados ou viroses no dia da coleta, com conseqüente uso de medicações por período de tempo limitado, exclui seu filho ou filha do estudo.

m) Caso venham a surgir dúvidas ou perguntas, sinta-se livre para contactar a responsável pela pesquisa, Ana Catarina de Miranda Mota, na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Ceará (sala 1) na Rua Monsenhor Furtado S/N ou pelos telefones: 4009-8408, 3261-7414, 87544702 ou entrar em contato com o CEP pelo telefone: 40098338.

Ao assinar este termo que consta de seu nome, nome de seu filho ou filha, idade, e número do prontuário, você estará declarando que por meio de livre e espontânea vontade sua e de seu filho ou filha, ele (a) estará participando como voluntário da pesquisa citada acima, de responsabilidade de Ana Catarina de Miranda Mota.

Fortaleza-CE., _____ de _____ de 200__

Assinatura do pai ou responsável



Assinatura da Testemunha

Assinatura da pesquisadora

APÊNDICE B- Ficha de anamnese
DADOS PESSOAIS

NOME: _____

IDADE: _____ DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____

NOME DO PAI: _____

NOME DA MÃE: _____

RESPONSÁVEL LEGAL: _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONE PARA CONTATO: _____

NOME DA ESCOLA: _____

ENDEREÇO DA ESCOLA: _____

ESTADO DE SAÚDE GERAL DA CRIANÇA

1) O seu filho ou filha encontra-se desnutrido (a)? SIM NÃO

Caso a sua resposta tenha sido SIM. Identificar grau de desnutrição. _____

2) O seu filho ou filha tem alguma doença crônica (além de desnutrição)? SIM NÃO

Caso a sua resposta tenha sido SIM, identifique. _____

3) O seu filho ou filha está tomando algum remédio? SIM NÃO

Quais? Caso a sua resposta tenha sido SIM. _____

4) O seu filho ou filha tem algum tipo de alergia? SIM NÃO

A que? Caso a sua resposta tenha sido SIM. _____

5) O seu filho ou filha esteve recentemente hospitalizado? SIM NÃO

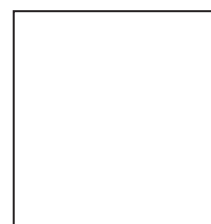
Para que? Caso a sua resposta tenha sido SIM. _____

Afirmo que as informações acima são verdadeiras.

Fortaleza-CE., _____ de _____ de 200_____

Assinatura _____

Testemunha _____



APÊNDICE C - Ficha de exame dentário

NOME DA CRIANÇA: _____

IDADE: _____ DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____

DATA: ____/____/____

EXAME EXTRA-ORAL

LINFADENOPATIA: PRESENTE AUSENTE

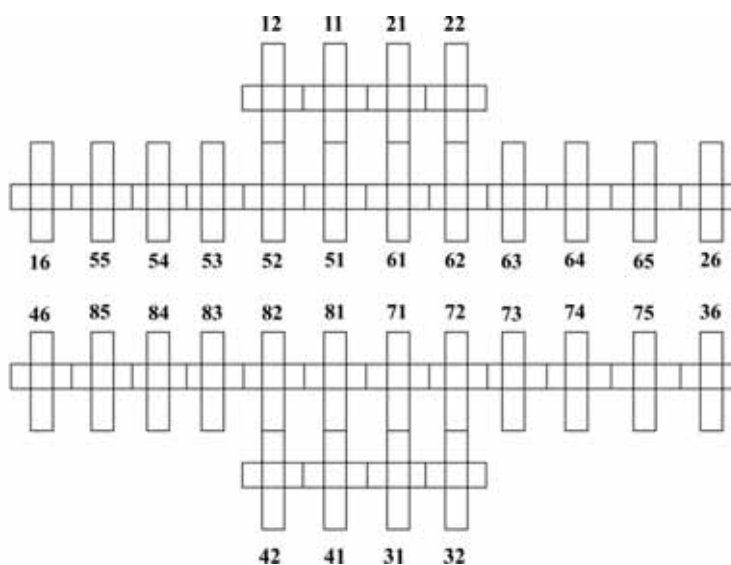
ASSIMETRIA FACIAL POR INFECÇÃO: PRESENTE AUSENTE

EXAME INTRA – ORAL

TECIDOS MOLES: NORMAIS PATOLÓGICOS

GRAU DE DESNUTRIÇÃO

EXAME DENTÁRIO



- Cor azul - corresponde às superfícies restauradas
- Cor vermelha-corresponde às superfícies cariadas
- x - corresponde a superfícies ausentes devido à cárie.

COMENTÁRIOS: _____

APÊNDICE D - Tabelas da Estatística Básica

Tabela 1. Estatísticas básicas da idade entre os estados nutricionais.

<i>ESPECIFICAÇÃO</i>	<i>GN</i>	<i>GI</i>	<i>GII</i>	<i>GIII</i>
n	48	31	59	30
média	60	36	39	29
desvio-padrão	15	14	17	16
mínimo	1	13	12	12
percentil 25	51	27	22	16
mediana	60	33	41	21
percentil 75	69	45	53	44
máximo	88	64	70	58

Tabela 2. Estatísticas básicas da contagem de EGM entre os estados nutricionais.

<i>ESPECIFICAÇÃO</i>	<i>GN</i>	<i>GI</i>	<i>GII</i>	<i>GIII</i>
n	48	31	59	30
média	83009	205331	593898	192883
desvio-padrão	167403	369738	1545830	456668
mínimo	0	0	0	0
percentil 25	0	0	0	0
mediana	6575	35000	5000	8375
percentil 75	90538	264000	260000	144188
máximo	550000	1640000	8240000	1785000

Tabela 3. Estatísticas básicas da CPT entre os estados nutricionais.

<i>ESPECIFICAÇÃO</i>	<i>GN</i>	<i>GI</i>	<i>GII</i>	<i>GIII</i>
n	48	30	59	30
média	1,747	1,341	1,124	1,784
desvio-padrão	0,734	0,943	0,623	0,952
mínimo	0,000	0,000	0,000	0,723
percentil 25	1,358	0,836	0,776	1,105
mediana	1,557	1,133	0,911	1,438
percentil 75	2,061	1,701	1,310	2,208
máximo	3,472	5,272	3,054	4,671

Tabela 4. Estatísticas básicas do ceo-s entre os estados nutricionais.

<i>ESPECIFICAÇÃO</i>	<i>GN</i>	<i>GI</i>	<i>GII</i>	<i>GIII</i>
n	48	31	59	30
média	2,0	2,3	1,9	3,6
desvio-padrão	4,4	4,5	3,8	13,1
mínimo	0	0	0	0
percentil 25	0	0	0	0
mediana	0	0	0	0
percentil 75	2	2	2	1,5
máximo	21	19	17	72

APÊNDICE E – artigo submetido a Revista de Nutrição

Desnutrição Energético-Protéica e Cárie Dentária na Primeira Infância: uma revisão de literatura

Protein-Energy Malnutrition and Early Childhood Caries: a review of the literature

Título abreviado: Desnutrição e Cárie Dentária

Dijane Pereira COSTA^{1,2}; Ana Catarina de Miranda MOTA¹; Glaucenira de Barros BRUNO^{2,3}; Maria Eneide Leitão de ALMEIDA^{2,4}; Cristiane Sá Roriz FONTELES^{2,5}

¹Mestrandas do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE) da Universidade Federal do Ceará;

²Professoras Doutoradas do Departamento de Clínica Odontológica da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE) da Universidade Federal do Ceará.

¹ Responsável pelo processo de revisão da literatura na área de cárie precoce da infância (CPI) e desnutrição. Tendo sido responsável por coordenar com as demais colaboradoras do trabalho a integração dos assuntos pesquisados e confecção do manuscrito. Parte deste trabalho foi extraída de seu projeto de tese.

² Colaborou com a revisão sobre a relação entre desnutrição e saliva. Parte deste trabalho foi extraída de seu projeto de tese. Participou da confecção do manuscrito.

³ Como coordenadora do projeto de extensão da UFC no IPREDE (Instituto de Prevenção à Desnutrição e Excepcionalidade), contribuiu na revisão de literatura feita sobre erupção dentária, hipoplasia de esmalte e CPI.

⁴ Co-orientadora do trabalho. Colaborou na correção do manuscrito.

⁵ Orientadora do trabalho e das teses acima referidas. Coordenou a confecção do manuscrito, desde seu processo inicial de revisão até a correção da versão final do artigo.

Endereço Institucional de todos os autores e co-autores:

UFC/Curso de Odontologia/Depto de Clínica Odontológica

Rua Monsenhor Furtado S/N. Bairro: Rodolfo Teófilo. Fortaleza, Ce. CEP: 60441-750

Endereço para correspondência:

Profa. Dijane Pereira Costa. Rua Antenor Rocha Alexandre, 171. Cidade dos Funcionários – Fortaleza, Ceará. CEP: 60.833-590. Fone: (085) 32712727 ou (085) 91034042. E-mail: dijanecosta@yahoo.com.br

RESUMO

O presente estudo tem por objetivo investigar a relação entre a desnutrição energético–protéica e a cárie dentária precoce na primeira infância. É uma revisão da literatura, feita mediante análise documental de produção bibliográfica, levantamentos em periódicos e consultas a livros. Verificou-se que a cárie precoce na infância é altamente prevalente nas comunidades de baixa renda, onde a desnutrição é um fator comum e de grande relevância. Estudos mostram que crianças desnutridas tendem a apresentar defeitos estruturais no esmalte do dente, como também se predis põem a um maior risco à cárie dentária. Portanto, uma deficiência energético-protéica durante a fase de desenvolvimento dentário (odontogênese) demonstra maior suscetibilidade à cárie dentária, atraso na cronologia de erupção e defeitos estruturais do esmalte (hipoplasia de esmalte), hipofunção das glândulas salivares e mudança na composição da saliva. Estes fatores podem ser os mecanismos mediante os quais a desnutrição é associada à cárie. Em conclusão, desnutrição e cárie precoce da infância são condições que apresentam elevado grau de inter-relação. Estudos associando desnutrição e cárie na primeira infância são de grande relevância para uma base de conhecimento científico mais ampla, com aplicações nas áreas de Nutrição e Odontologia.

Termos de indexação: desnutrição, cárie dentária, infância.

ABSTRACT

The present study aimed to investigate the relationship between protein-energy malnutrition and early childhood caries. It constitutes a literature review based on documental analysis of bibliographic searches, surveys of scientific journals and books. Early childhood caries was found to be highly prevalent in low income communities, where malnutrition is a common factor of great relevance. Studies have shown that malnourished children have a tendency of developing enamel structural defects, which predisposes towards a higher risk of experiencing dental caries. Therefore, protein energy malnutrition during the stage of dental formation (odontogenesis) is associated with increased caries susceptibility, delayed chronology of eruption and enamel structural defects (enamel hypoplasia). In conclusion, early childhood caries and protein-energy malnutrition are highly related conditions. Studies on both subjects should be of great importance in structuring the basis of a scientific knowledge in this matter, with a vast repercussion in the fields nutrition and dentistry.

Indexing terms: malnutrition, dental caries, childhood.

INTRODUÇÃO

A desnutrição energético-proteica (DEP) ocorre quando existe deficiência no consumo de proteínas com relação às necessidades do corpo¹. Esta patologia (DEP), ou simplesmente desnutrição, é uma das mais comuns e a mais importante das deficiências nutricionais, vitimando cerca de 200 milhões de crianças menores de 5 anos no mundo². A DEP em seus diferentes estádios, desde as formas mais leves, capazes de expressar déficits discretos do crescimento ou pequenas perdas de peso, até as manifestações mais graves, como o Kwashiorkor (desnutrição edematosa) e o marasmo, constitui-se uma das mais difundidas doenças carenciais e um dos maiores problemas de saúde coletiva³.

O Kwashiorkor e o marasmo se manifestam clinicamente de forma distinta. As principais características do Kwashiorkor são retardo no crescimento, perda de gordura subcutânea e muscular, menos intensa do que no marasmo, edema depressível que se localiza, principalmente, nas pernas, mas que pode atingir todo o corpo, e alterações mentais e de humor. Tanto o couro cabeludo, com alterações nos cabelos (textura, cor, perda de brilho e queda), generalizadas ou localizadas (sinal da bandeira), como o tecido cutâneo, com lesões de despigmentação e descamação, podem estar afetados. Anorexia, diarreia, infecções e deficiências de micronutrientes (vitamina A, zinco e ferro) são também frequentemente encontradas. Um significativo grau de perda de peso e a presença de edema são os aspectos essenciais para o diagnóstico de Kwashiorkor⁴. Ademais, o baixo peso ao nascer (< 2.500 g) pode ser tomado como um bom indicador do risco da desnutrição materno-fetal. Nos países com boas condições de saúde e nutrição, menos de 8% das crianças, ao nascimento, têm peso inferior a 2.500 g; em contrapartida nas áreas de pobreza, estes índices crescem para 30% dos nascimentos ocorridos⁵.

No Brasil, a desnutrição apresenta-se elevada, especialmente no Nordeste, onde a prevalência atinge, em algumas comunidades, até 70% das crianças na primeira infância⁶. Nestas, as alterações marcantes da DEP consistem no atraso do crescimento e do desenvolvimento, diminuição das massas muscular e adiposa, infiltração gordurosa do fígado, lesões de pele e redução das proteínas séricas, dentre outras⁷. O Brasil é uma nação duramente atingida pela desnutrição, fundamentalmente por conta do processo econômico-social aqui desenvolvido⁸.⁹ Duas condições intimamente relacionadas com o padrão de vida da população, consumo alimentar inadequado e infecções de repetição, onde se incluem o acesso à alimentação, moradia e assistência à saúde, relacionam-se com a DEP¹⁰. Quanto à origem, caracteriza-se como primária (dieta deficiente) ou secundária (condicionada). Enquanto na desnutrição primária o consumo inadequado de nutrientes é o fator determinante desta patologia, a secundária é causada por outros fatores, diferentes da dieta, como, por exemplo, a absorção e utilização dos nutrientes¹¹. Portanto, o indivíduo desnutrido é aquele cujas células não recebem os nutrientes de que necessita para desempenhar suas funções de produção energética, formação ou reparação tecidual e regulação do seu próprio funcionamento¹².

A cárie dentária, outro grave problema de saúde pública, é considerada uma doença infecciosa crônica multifatorial, dependente da interação de quatro fatores essenciais: o hospedeiro, representado pela saliva e pelos dentes, a microbiota bucal específica, a dieta e o tempo¹². A deficiência nutricional na primeira infância pode impactar em diversos destes fatores, com potencial de alterar as condições presentes no ambiente da cavidade oral. O presente trabalho é fruto de ampla revisão de literatura sobre estas duas condições, onde serão discutidos os diversos fatores alterados pela DEP, capazes de impactar nos riscos de desenvolvimento da cárie precoce da infância.

CÁRIE DENTÁRIA

A cárie consiste na destruição dos tecidos dentários, causada por microbiota específica, sendo considerada uma doença infecciosa crônica multifatorial¹². Na dentição decídua, é uma doença comum e de natureza agressiva, denominada cárie precoce da infância (CPI), cuja prevenção pode ser iniciada nos primeiros anos de vida, no consultório odontológico¹³. Como outros tipos de cárie dentária, a CPI é causada por estreptococos do grupo *mutans* (EGM), que fermentam carboidratos da dieta, produzindo ataque ácido a dentes susceptíveis, durante determinado período. Possivelmente a imaturidade do sistema imune aliada à ineficácia na higienização da cavidade oral, hábitos alimentares indevidos e às propriedades estruturais de dentes recém-erupcionados, confere à CPI o caráter agressivo e de rápido desenvolvimento característico da doença¹⁴.

Dados reportados nos Estados Unidos relatam uma prevalência de cárie dentária cinco vezes maior do que a da asma, e sete vezes maior do que a da rinite alérgica^{15,16}, afetando 80% da população infante-juvenil americana, sendo também considerada a quinta doença mais onerosa ao tratamento no Reino Unido¹⁷. No Brasil, constitui o principal agravo com que se defronta a Odontologia Social. Quase 27% das crianças, de 18 a 36 meses, apresentam pelo menos um dente decíduo com experiência de cárie, chegando à proporção de quase 60% das crianças com 5 anos de idade¹⁸.

Poucos estudos mostram associação entre desnutrição e cárie dentária. Infante & Gillespie¹⁹ em 1976, examinando 528 crianças com desnutrição moderada de 1 a 6 anos de idade da zona rural da Guatemala, encontraram duas vezes mais cáries do que em crianças americanas brancas da mesma faixa etária. Em 1977, os autores, em outro estudo, puderam observar que crianças com hipoplasia de esmalte linear (HEL) tinham maior experiência de cárie nos dentes posteriores do que as crianças que não apresentavam HEL, sugerindo um sinergismo entre desnutrição e infecção, podendo predispor ao aparecimento de HEL²⁰.

Alvarez et al.²¹, em 1988, examinando 285 crianças peruanas de 3 a 9 anos de idade, observaram que a desnutrição crônica tornava os dentes decíduos mais susceptíveis ao aparecimento de cárie, e afetava a esfoliação destes. Em 1990, Alvarez et al.²², examinando 1481

crianças peruanas de 1 a 13 anos de idade, concluíram haver atraso no desenvolvimento dentário ocasionado pela desnutrição, podendo esta também afetar a distribuição da cárie dentária por idade, resultando em um aumento da experiência de cárie na dentição decídua. O estudo de 209 crianças peruanas confirmou que existe relação de causa e efeito entre desnutrição precoce e aumento de cárie dentária²³. Em 1995, Alvarez²⁴ relatou que um só episódio de desnutrição leve ou moderada no primeiro ano de vida possui a capacidade de aumentar a manifestação da cárie dentária, tanto na dentição decídua, como anos depois na dentição permanente.

Johansson et al.²⁵, examinando crianças indianas normais e com desnutrição moderada, encontraram maior número de lesões cariosas entre crianças desnutridas. Os autores concluíram que desnutrição crônica na infância em fase de crescimento aumenta o potencial cariogênico oriundo dos carboidratos fermentáveis da dieta. A pesquisa de 1994 confirmou esses achados²⁶. Li et al.²⁷, estudando 1344 crianças chinesas da zona rural, puderam observar que a deficiência nutricional tem importante impacto no desenvolvimento dentário e suscetibilidade à cárie.

ERUPÇÃO DENTÁRIA

Atualmente, existe evidência de que a desnutrição pode conduzir ao retardo da erupção dos dentes decíduos. Infante & Gillespie¹⁹; Alvarez & Navia²⁸; Alvarez et al.^{22, 23} e Duarte²⁹; verificaram que a desnutrição retarda a cronologia de erupção dentária, implicando dizer que crianças desnutridas têm seus dentes expostos ao meio bucal mais tardiamente. Segundo Alvarez²⁴, este atraso de erupção altera o padrão de desenvolvimento da cárie dentária, já que a colonização da cavidade oral por EGM ocorre após a erupção do primeiro dente, pois se faz necessária a presença de uma superfície que permita a organização de um biofilme cariogênico³⁰.

HIPOPLASIA DO ESMALTE

A hipoplasia de esmalte pode ser definida como um defeito envolvendo a superfície do esmalte, associado a uma redução em sua espessura, com a presença de sulcos ou depressões. Em contrapartida, a opacidade (ou hipocalcificação) é definida como um defeito qualitativo, identificado visualmente como uma anormalidade na translucidez do esmalte, com áreas branco-opacas, amareladas ou acastanhadas, sem perda de continuidade da superfície afetada^{31,32}.

Infante & Gillespie^{19,20} observaram em seus estudos que a desnutrição predisponha ao aparecimento de hipoplasia de esmalte linear. Alguns anos mais tarde, Suckling et al.³³ verificaram uma associação entre hipoplasia do esmalte e desnutrição.

Sawyer & Nwoku³⁴ pesquisaram o nível de saúde oral em 52 crianças com desnutrição severa, idades de 1 a 5 anos, oriundas de uma área rural da Nigéria. Os autores encontraram hipoplasia de esmalte em 18,6% das crianças desnutridas, enquanto que, no grupo com ausência de desnutrição, não houve registro dessa alteração. Segundo Li et al.²⁷, a prematuridade aliada a um baixo peso ao nascer enseja uma associação significativa com o desenvolvimento de hipoplasia de esmalte, um

importante fator para o início e progressão da cárie dentária. De fato, Bhaskar³⁵ afirmou que uma deficiência nutricional pode modificar a formação do esmalte, promovendo a ocorrência de patologias, representadas especialmente pela hipoplasia e hipocalcificação dos dentes.

HIPOFUNÇÃO DAS GLÂDULAS SALIVARES

A saliva é o principal fator do hospedeiro capaz de fornecer proteção às estruturas dentárias, impedindo o desenvolvimento da doença cárie^{36,37,38,39}. Dentre as muitas propriedades inerentes ao fluido salivar, encontra-se: um sistema-tampão com capacidade neutralizadora dos ácidos^{36,37,40}; funções remineralizadoras^{36,37,40,41} e de retardo da desmineralização do esmalte^{37,40,41}. Ademais, seus fatores antimicrobianos são a primeira linha de defesa da cavidade oral^{36,37,38,40,41}; presentes na placa bacteriana^{36,38} e na película dental, conferindo proteção contra agressões químicas e físicas^{36,37,38}. Hipofunção das glândulas salivares pode ser definida pela redução do fluxo salivar, capacidade-tampão e constituintes salivares, principalmente as proteínas⁴², o que predispõe a maior prevalência de cárie dentária. Há um número pequeno de estudos investigando desnutrição e hipofunção salivar em seres humanos.

Em 1977, McMurry et al.⁴³ verificaram em população de crianças colombianas desnutridas a redução nos níveis de imunoglobulina A. Os componentes salivares de crianças egípcias, normais e desnutridas, foram estudados, tendo-se observado nos casos edematosos, aumento nos níveis dessas moléculas; contudo, nos casos não edematosos grau II, redução destes constituintes foi observada. Assim, os autores sugeriram ser a elevação das proteínas salivares nos casos edematosos o possível resultado de um severo envolvimento glandular⁴⁴. Ao examinar uma população de 94 crianças indianas, normais e desnutridas, Agarwal et al.⁴⁵ encontraram níveis diminuídos de proteínas salivares em função da severidade da desnutrição. Comparação entre crianças gambianas e britânicas levou à identificação de níveis reduzidos de imunoglobulina A, sendo o fato atribuído às diferenças nutricionais entre os grupos estudados⁴⁶.

Johansson et al.²⁵, estudando crianças indianas não desnutridas e com desnutrição moderada, encontraram fluxo de secreção salivar estimulada diminuído na população desnutrida, fato não observado com relação à saliva não estimulada. Outro dado de importância descrito foi a redução na capacidade-tampão salivar segundo o grau de desnutrição identificado. Em 1994, Johansson et al.²⁶, estudando a composição salivar em crianças com desnutrição crônica, mais uma vez encontraram redução do fluxo de secreção salivar estimulado e da capacidade-tampão. Segundo os autores, crianças com desnutrição moderada ou severa tiveram também diminuição dos íons cálcio e da secreção de proteínas na saliva estimulada. Houve prejuízo imunológico para as crianças desnutridas, com reduzida aglutinação dos fatores de defesa na saliva não estimulada.

CONCLUSÕES

A revisão de literatura ora apresentada conduziu as seguintes conclusões:

1. a dieta e a nutrição desempenham papel significativo no desenvolvimento dentário e na integridade dos tecidos orais;
2. há uma associação entre cárie dentária na dentição decídua e desnutrição na primeira infância;
3. a cárie precoce da infância é bastante freqüente nas comunidades de baixa renda, onde a desnutrição é um fator comum e de grande relevância;
4. deficiência energético-protéica durante a fase de desenvolvimento dentário (odontogênese) enseja atraso na cronologia de erupção, defeitos estruturais no esmalte (hipoplasia), com aumento significativo no risco à doença cárie;
5. a desnutrição pode afetar as glândulas salivares, por meio da redução de seu fluxo e alteração da composição da saliva, aumentando assim a susceptibilidade dos dentes às lesões de cárie; e
6. estudos associando desnutrição e cárie na primeira infância são úteis, constituindo uma base de conhecimento científico com aplicações amplas nas áreas de Nutrição e Odontologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shils ME, Olson JA, Moshe S. Modern Nutrition in Health and Disease. 9nd ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 1999.
2. Batista Filho M. Introdução à Nutrição. In: Figueira F, Schwambach OF, Alves JGB. Pediatria – IMIP. 2nd ed. Rio de Janeiro: Ed. Médica e Científica Ltda; 1996. p.68.
3. Rombeau JL. Passado, presente e perspectivas do suporte nutricional. In: Waitzberg DL. Nutrição Enteral e Parenteral na Prática Clínica. 2nd ed. São Paulo: Atheneu; 1998.p.317.
4. OMS. Manejo da desnutrição grave: um manual para profissionais de saúde de nível superior (médicos, enfermeiros, nutricionistas e outros) e seus auxiliares. Genebra/Brasília: Organização Mundial da Saúde/Organização Panamericana da Saúde; 2000.
5. UNICEF. Situação Mundial da Infância, 1998. A Nutrição em Foco. Brasília, 1998.
6. Arruda BKG & Arruda IKG. Aspectos geopolíticos e epidemiológicos da desnutrição. In: Figueira F, Schwambach OF, Alves JGB. Pediatria – IMIP. 2nd ed. Rio de Janeiro: Ed. Médica e Científica Ltda; 1996. p.70.

7. Wood CH, Carvalho JAM. A Demografia da desigualdade no Brasil. 27nd ed. Rio de Janeiro:27^a ed IPEA; 1994. p. 330.
8. Valente FLS. Inserção de componentes de alimentação e nutrição nas políticas governamentais e na estratégia nacional de desenvolvimento. Relatório Final FAO, Brasília, 1996.
9. Devincenzi MU, Lessa AC, Sigulem DM. Nutrição em saúde pública. In: Lopez FA, Brasil ALD. Nutrição e Dietética em Clínica Pediátrica. São Paulo:Editora Atheneu; 2004.p.127-37.
10. Oliveira JED. Ciências Nutricionais.1^aed. São Paulo: Sarvier; 1998.
11. Borsoi MA. Nutrição e dietética: noções básicas. São Paulo: SENAC-SP; 2001.
12. Newbrun E. Cariologia. 2nd ed. São Paulo: Santos, 1988.
13. Krol DM. Educating pediatricians on children's oral health: past, present, and future. *Pediatrics*. 2004; 113 (5):E487-92.
14. Seow WK. Biological mechanisms of early childhood caries. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1998; 26(1 Suppl):8-27.
15. Pierce KM, Rozier RG, Vann WF. Accuracy of pediatric primary care providers screening and referral for early childhood caries. *Pediatrics*. 2002; 109(5): E82-2.
16. Hale KJ. American Academy of Pediatrics Section on Pediatric Dentistry. Oral health risk assessment timing and establishment of the dental home. *Pediatrics*. 2003; 111 (5 Pt 1):1113-6.
17. Maia MCG, Sampaio HAC, Silva CAB. Saúde Bucal Coletiva: Metodologia de trabalho e Práticas. 1^aed. São Paulo: Santos; 2006. p.139-53.
18. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica, Coordenação Nacional de Saúde Bucal. Projeto SB Brasil 2003 - Condições de saúde bucal da população brasileira. 2002-2003.
19. Infante PF, Gillespie GM. Dental caries experience in the deciduous dentition of rural Guatemalan children ages 6 months to 7 years. *J Dent Res*. 1976; 55(6): 951-7.

20. Infante PF, Gillespie GM. Enamel hypoplasia in relation to caries in Guatemalan Children. *J Dent Res.* 1977; 56(5): 493-8.
21. Alvarez JO, Lewis CA, Saman C, Caceda J, Montalvo J, Figueiroa ML. Chronic malnutrition, dental caries, and tooth exfoliation in Peruvian children aged 3-9 years. *Am J Clin Nutr.* 1988; 48(2): 368-72.
22. Alvarez, J. O.; Eguren, J. C.; Caceda, J.; Navia, J. M. The effect of nutritional status on the age distribution of dental caries in the primary teeth. *J Dent Res.* 1990; 69(9): 1564-6.
23. Alvarez JO, Caceda J, Woolley TW, Carley KW, Baiocchi N, Caravedo L, Navia JM. A longitudinal study of dental caries in the primary teeth of children who suffered from infante malnutrition. *J Dent Res.* 1993; 72(12): 1573-6.
24. Alvares JO. Nutrition, tooth development, and dental caries. *Am J Clin Nutr.* 1995; 61(2): 410S-6S.
25. Johanson I, Saellstron AK, Rajan BP, Parameswaran. A. Salivary flow and dental caries in Indian children suffering from chronic malnutrition. *Caries Res.* 1992; 26(1): 38-43.
26. Johanson I, Lenander-Lumikari M, Saellström AK. Saliva composition in Indian children with chronic protein-energy malnutrition. *J Dent Res.* 1994; 73(1): 11-9.
27. Li Y, Navia JM, Bian JY. Caries experience in deciduous dentition of rural Chinese children 3-5 years old in relation to the presence or absence of enamel hipoplasia . *Caries Res.* 1996; 30(1): 8-15.
28. Alvarez J, Navia JM. Nutricional status, tooth eruption, and dental caries. *Am J Clin Nutr.* 1989; 49(3): 417-26.
29. Duarte RC. Prevalência de cárie na dentição decídua em crianças nutridas e desnutridas da Grande João Pessoa com base no índice ceo-s [dissertação]. Pernambuco: Universidade de Pernambuco; 1992.
30. Berkowitz RJ, Jordan HV, White G. The early establishment of *Streptococcus mutans* in the mouths of infants. *Arch Oral Biol.* 1975; 20(3): 171-4.
31. Seow WK. Enamel hipoplasia in the primary dentition: a review. *ASDC J Dent Child.* 1991; 58(6): 441-52.

32. Aine, L et al. Enamel defects in primary and permanent teeth of children born prematurely. *J Oral Pathol Med.* 2000; 29(8): 403-9.
33. Suckling G, Elliott DC, Thurley DC. The production of developmental defects of enamel in the incisor teeth of penned sheep resulting from induced parasitism. *Arch Oral Biol.* 1983; 28(5): 393-9.
34. Sawyer, DR, Nwoku, AL. Malnutrition and the oral health of children in Ogbomosho, Nigeria. *Journal of Dentistry for Children.* 1985; 52(2): 141-5.
35. Bhaskar SN. *Histologia e Embriologia Oral de Orban.* São Paulo: Artes Médicas, 1978. p. 484.
36. Farias DG, Bezerra AC. B. Salivary Antibodies, Amylase And Protein From Children With Early Childhood Caries. *Clin Oral Invest.* 2003; 7(3): 154-7.
37. Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JGM, Veerman ECI. Salivary Proteins: Protective and Diagnostic Value in Cariology? *Caries Res.* 2004; 38(3): 247-53.
38. Simmonds, RS, Tompkins GR, George RJ. Dental caries and the microbial ecology of dental plaque: a review of recent advances. *N Z Dent J.* 2000; 96(424): 44-9.
39. Tenovuo J, Lagerlöf F. Saliva. In: Thylstrup A, Fejerskov O. *Cariologia Clínica.* 2nd ed . São Paulo: Santos; 1995.
40. Lagerlöf F, Oliveby A. Caries-protective factors in saliva. *Adv Dent Res.* 1994; 8(2): 229-38.
41. Denny PC, Denny PA, Klauser DK, Hong SH, Navazesh M, Tabak LA. Age-related changes in mucins from human whole saliva. *J Dent Res.* 1991; 70(10): 1320-7.
42. Psoter WJ, Reid BC, Katz RV. Malnutrition and dental caries: a review of the literature. *Caries Res.* 2005;39(6):441-7.
43. McMurray DN, Rey H, Casazza LJ, Watson RR. Effect of moderate malnutrition on concentrations of immunoglobulins and enzymes in tears and saliva of young Colombian children. *Am J Clin Nutr.* 1977; 30(12):1944-8.
44. Ibrahim AM, EL-Hawary MF, Sakr R. Protein-calorie malnutrition (PCM) in Egypt immunological changes of salivary protein in PCM. *Z Ernährungswiss.* 1978; 17(3): 145-52.
45. Agarwal PK, Agarwal KN, Agarwal DK. Biochemical changes in saliva of malnourished children. *Am J Clin Nutr.* 1984; 39(2):181-4.
46. Azzopardi D, Watson JG. Gambian children have less salivary secretory immunoglobulin A than British children. *J Trop Pediatr.* 1986; 32(3):120-2.

APÊNDICE F – Artigo submetido a Revista Caries Research**Title: Caries experience, mutans streptococci levels and total protein concentration in Brazilian children with protein-energy malnutrition**

Authors: Ana Catarina de Miranda Mota¹, Dijane Pereira Costa¹, Cibele Barreto Mano de Carvalho², Cláudia Ferreira Santos³, André Jalles Monteiro⁴, Karla Shangela da Silva Alves⁵, Tatiana Maria Rocha Santos⁵, Manassés Claudino Fonteles⁶, Cristiane Sá Roriz Fonteles⁶

Affiliations: ¹ Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil; ² Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil; ³ Laboratory of Cardiovascular and Celular Pharmacology, State University of Ceará, Fortaleza, Brazil; ⁴ Department of Statistics and Applied Mathematics, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil; ⁵ School of Dentistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil; ⁶ Laboratory of Metabolic Pharmacology and Celular Physiology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

Running Title: Dental caries and malnutrition in early childhood

Corresponding Author:

Dr. Cristiane Sá Roriz Fonteles

Unidade de Pesquisas Clínicas / Universidade Federal do Ceará

Laboratório de Farmacologia Metabólica e Fisiologia Celular

Avenida José Bastos, 3390, sala 106, Caixa Postal 3229

CEP 60.436-160, Fortaleza-Ce, Brazil

Work: (55) (85) 33668439 Home: (55) (85) 32645523 Fax: (55) (85) 33668445

E-mail: cfontele@ufc.br

Key-words: Protein-energy malnutrition; early childhood caries; mutans streptococci; salivary proteins.

Declaration of Interest

There was no conflict of interests involving any of the participating authors in this research. Thus, no personal or financial relationship that might introduce bias or affect the author's judgment was identified during this study or during the construction of this paper.



Cristiane Fonteles
Corresponding Author

Abstract

Our aim was to compare caries experience, severity of early childhood caries (ECC), salivary mutans streptococci (MS) levels and total protein concentration (TPC) among nourished and malnourished children. One hundred and twenty 12 – 70 months-old children, with or without ECC were selected to participate in the study, and divided into mildly (GI, n=31), moderately (GII, n=59) or severely (GIII, n=30) malnourished, according to WHO 2006 growth standards. Forty-seven nourished children were used as controls (GN). Unstimulated whole saliva was collected from all participants and centrifuged. Supernatants were extracted, lyophilized, stored at – 20°C and analyzed for TPC using the Bradford method. Stimulated whole saliva was collected and used for MS detection on MSB agar medium (cfu/mL). Dental examination was performed for calculation of dmfs scores and severity of ECC. No significant association was observed between presence and absence of severe ECC in GI, GII or GIII ($p = 0.3233$). When comparing GI, GII, GIII and GN there was a statistically significant difference in age ($p = 0.0000$) and TPC ($p = 0.0000$), but no differences in MS counts ($p = 0.5406$) or caries experience ($p = 0.6094$). GIII children were the youngest among all groups, and presented higher TPC than children in GI/GII groups ($p = 0.0002$). TPC did not differ statistically when comparing GIII and GN ($p = 0.5309$). Our results suggest that nutritional status increases protein salivary content in severely malnourished children and does not predispose to higher salivary MS levels or increased caries experience during early childhood.

Introduction

Globally, early childhood caries (ECC) and protein-energy malnutrition (PEM) remain significant public health issues in many different countries. The time encompassing gestation through age 5 is the most vulnerable nutritional phase in the human life cycle. Therefore, rapid growth and the development of the immune system against infections determine unique dietary needs, generating a higher impact at this stage than in latter developmental periods [Dutra-De-Oliveira and Marchini, 2003]. Unfortunately, the highest prevalence of PEM is observed during early childhood, especially between ages 2 and 5 [WHO, 2000], being also a time in which the presence of dental caries can be unusually aggressive, with the potential for increasing feeding difficulties, added risk of infection [Schwartz, 1994], impacting on weight gain [Ayhan et al., 1996] and child's well being [Low et al., 1999].

Nutritional status expresses the relationship of a macro or micronutrient to the body at any given time, and PEM occurs in the presence of deficiencies in the intake of protein, calories, or both, relative to the body's nutritional requirements [Dutra-De-Oliveira and Marchini, 2003]. PEM is a condition that results from inadequate consumption of nutrients or from interference in oral intake, absorption, or from the body's ability to utilize the ingested nutrients, due to disease or increased nutritional needs [Dutra-De-Oliveira and Marchini, 2003]. Malnutrition affects different populations world-wide, impacting on health, mortality and productivity, being

also a potentiating factor in about half the deaths yearly among children under age 5 [Pelletier et al., 1995]. Thus, 26.7% of the world's children in this age group, are still malnourished when measured in terms of weight-for-age. Nevertheless, when measures of height-for-age are considered, over 180 million children under 5 years of age are malnourished [WHO, 2000].

ECC is an infectious and transmissible disease of the primary dentition, with a complex and multifactorial etiology involving cariogenic microorganisms, fermentable carbohydrates and nonshedding tooth surfaces [Ramos-Gomez et al., 2002]. Under a favorable environment, these variables will interact initiating the caries process and giving rise to its continuance. The frequent consumption of fermentable carbohydrates, especially inappropriate infant bottle-feeding habits can significantly increase the severity of ECC [Hallett and O'Rourke, 2006]. Hence, caries pattern can be affected by age, dental morphology, eruption sequence, diet and behavioral factors [Ölmez et al., 2003]. According to the American Academy of Pediatric Dentistry (AAPD), a child should be diagnosed as having ECC if at least one carious cavitated or noncavitated dental surface is present, missing (due to caries) or filled (dmfs), on a primary tooth, right after dental eruption until 71 months-age. In addition, any sign of smooth-surface caries before age 3 indicates the presence of severe-ECC. Although previous caries experience remains one of the best predictors of future caries activity [Bowden, 1997], measurements of salivary MS will allow identification of children at greater risk of developing ECC [Thibodeau and O'Sullivan, 1999].

Nutritional deficiency has an important influence over dental development and disease. It has been previously demonstrated that children with PEM have delayed dental eruption and exfoliation, higher prevalence of enamel hypoplasia and salivary gland hypofunction [Psoter et al., 2005]. The proven influence of PEM over caries-related predisposing risk factors has led to the understanding that malnourished children have higher caries experience in the primary [Alvarez et al., 1990] and permanent [Alvarez, 1995] dentitions. Since a greater relevance in terms of PEM is attributed to the host factors associated with caries, such as tooth defects and the salivary system, whether the child's nutritional status alone changes the risk of developing dental caries remains to be established. Thus, the present study has aimed to compare caries experience, severity of ECC, salivary MS levels and total protein concentration in four different groups of children, either nourished or malnourished with mild (I), moderate (II) or severe (III) degrees of malnutrition, to test the hypothesis that malnourished children would be more susceptible to dental caries, expressing higher caries experience.

Materials and Methods

Population and Study Design

This was a case-control study in which 120 children with PEM, from both genders (equal distribution), ages varying from 12 to 70 months (mean age of 41 months), with (n=44) or without (n=76) ECC were selected from a low income population who attended the Institute

for Preventing Malnutrition and Exceptionality (IPREDE), a reference center in the treatment of malnutrition in the state of Ceará (Brazil). These children were divided into three different groups of malnourishment levels, according to WHO 2006 growth standards: mild (< -1 to > -2 Z-score), moderate (< -2 to > -3 Z-score) or severe (< -3 Z-score) PEM, for instance malnutrition grades I (GI, n=31); II (GII, n=59), or III (GIII, n=30), respectively. The Z-score (number of standard deviations a child is from the average) for anthropometric measurements was calculated using Epi Info version 6.0 (Centers for Disease Control, Atlanta, USA) by inserting child's date of birth, gender, weight and height/length. Forty-seven nourished and healthy children who attended the Pediatric Dental Clinic at the Federal University of Ceará, from both genders, within the same age range and caries status (caries free, n=22; ECC, n=25) were also enrolled to participate in the study and used as controls (GN). The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Ceará Medical School, Brazil. Consent forms were signed by parents or legal guardians, prior to patient enrollment in the study.

Saliva Samples

Unstimulated whole saliva was collected from all participants, during 60 seconds, by using a disposable cannula, placed into plastic tubes, centrifuged at $3,000 \times g$ during 5 minutes, at 32°C . A corresponding volume of 100-200 μL of the supernatants was extracted, lyophilized and stored at -20°C for posterior total protein analysis. Subsequently, patients were asked to chew on a standard piece of Parafilm[®] during 60 seconds in order to stimulate salivary secretion and release plaque into the salivary fluid. Saliva was then collected with a disposable plastic cannula and stored in sterile Ependorfs[®]. Samples were transported to the laboratory for microbiological analysis in a hermetically sealed case containing ice, and analyzed no longer than 2 hours after collection [Ruoff et al., 2003]. In order to control for circadian rhythm, saliva samples were collected between 8 and 11:30 AM.

Examination

Dental examination was performed by only one examiner, through visual/tactile method, in order to determine caries experience, based on the number of decayed, missing and filled surfaces (dmfs scores). Participants were separated into two different groups: children who had (dmfs > 0) and had not experienced dental caries (dmfs = 0). In order to control for confounders, the number and location of erupted and hypoplastic teeth were recorded for each child. Tooth surface was the unit used to register carious lesions. A tooth was considered erupted if any part of the crown had penetrated the gingival tissues. Children having at least one affected primary tooth surface were considered to have ECC. Cavitated and non-cavitated (white spot) lesions were recorded, and severity of ECC was registered based on AAPD guidelines [2008]. Hence, severe ECC was considered to be present in any of the following situations: (1) before age 3, when any sign of smooth-surface caries was identified; (2) from ages 3 – 5, when there was a primary upper anterior smooth-surface dmf ≥ 1 or when dmfs scores ≥ 4 (age 3), ≥ 5 (age 4), or ≥ 6 (age 5) were noted.

Microbiological Analysis

Stimulated whole saliva samples were serially diluted in saline, establishing dilutions of 1:100 and 1:1000. Aliquots of 100 μ L from the different dilutions were then placed in duplicates on Mitis Salivarius Bacitracin (MSB) agar plates (Difco, Detroit, Michigan, USA) [Gold et al., 1973]. The plates were then incubated at 37°C, during 48 hours, in jars, under microaerophilic conditions. Representative colonies with morphological characteristics of MS were counted, isolated and biochemically confirmed to be MS utilizing mannitol fermentation test. Bacterial counts were expressed as colony forming units (CFU) per milliliter of saliva. According to the different levels of contamination, patients were considered as having low (undetectable CFU), moderate (1-99,000 CFU) or high (>100,000 CFU) salivary MS counts.

Total Protein Analysis

Unstimulated whole saliva was analyzed for the salivary concentration of total protein (TPC) by the Coomassie blue method [Bradford, 1976], with serum bovine albumin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) used as a standard. The lyophilized saliva samples were reconstituted by adding 50 μ L of Milli-Q water, and homogenized using a mechanical agitator (Vortex®, AP-56, Phoenix, São Paulo, Brazil). Subsequently, 10 μ L of the reconstituted sample was withdrawn, and 2.5 mL of Bradford solution was added, re-homogenized and put to rest for 10 minutes for absorbance reading in a spectrophotometer (Ultraspec 1100, Pharmacia, England). An absorbance of 595 nm was used.

Statistical Analysis

Kruskal-Wallis test was applied to verify any existing differences in age, MS counts, TPC and dmfs scores between GI, GII, GIII and GN; as well as for comparisons of these variables among caries-free children and those with and without severe ECC. Mann-Whitney test was used for comparisons of age, MS counts, TPC and dmfs scores between genders and between GI and GII, GN and GI/GII, GIII and GI/GII, GN and GIII. For comparisons between genders among caries-free children and those with and without severe ECC Chi-square test was used. To verify monotonic relation between the different variables Spearman Rank Correlation Coefficient was applied. Only differences with a p-value < 0.05 were considered as statistically significant.

Results

From the 45 malnourished children (37.5%) participating in the present study who presented a history of present or past dental caries experience, a total of 7 children (15.55%) presented carious surfaces on the anterior teeth only, 22 children (48.89%) presented carious surfaces on the posterior teeth only, and 16 participants (35.56%) had carious surfaces on both the anterior and posterior dentitions. In GN, 25 (53.2%) presented a history of caries experience (dmfs > 0). In this group of children, carious surfaces affected only the anterior teeth in a total of 3 children (12%), only the posterior teeth in 15 (60%), while 7 (28%) children had carious surfaces affecting both the anterior and posterior dentitions. White spot lesions were identified in only 7 malnourished (15.9%) and 6 GN (24%) children. The second primary molar was the most affected primary tooth by dental caries among malnourished and GN children, followed

by the first deciduous molar and upper central incisor. In GN, upper central incisors and canines were equally affected, followed by lateral incisors, whereas among the malnourished children the upper central incisor was followed by lateral incisors and upper canines. Lower incisors were not affected by dental caries in any of the studied groups. MS was present in the saliva of 69 children in the malnourished groups (57.5%), of which 30 (25%) children were moderately and 39 (32.5%) were highly contaminated with MS. In GN, the percentage of children with detectable levels of MS was of 65.96%, for instance 31 children. In this group, 12 (38.71%) children were considered to be highly contaminated with MS, whereas 19 (61.29%) children had moderate salivary MS levels. A total of 3 (2.5%) children were identified as having enamel hypoplasia, one in GII (primary upper central incisors were affected) and 2 in GIII (upper canines and molars). In contrast, 6 GN children (12.5%) presented 11 affected teeth, consisting of primary molars, central incisors and canines.

Malnutrition levels, severity of ECC, age and gender

When comparing ages between genders in the different malnutrition levels, boys GIII were found to be significantly younger than girls ($p = 0.0028$) (fig. 1A). However, no difference between genders was observed for TPC (fig. 1B), MS levels (fig. 2A) or dmfs scores (fig. 2B) in GN, GI, GII or GIII. Furthermore, no significant association was observed between genders and severity of ECC ($p=0.6677$). Comparison between ages among children who were caries-free, and children with and without severe ECC demonstrated a statistical significant difference ($p=0.0000$), for instance severe ECC was more often present among children at older ages. This finding did not depend on the child's nutritional status. Comparison of presence and absence of severe ECC between GI, GII and GIII showed no significant association between these variables ($p = 0.3233$). Thus, severity of ECC was not associated with an increased severity of malnutrition (table 1).

Malnutrition levels and ECC

Comparisons between children without ECC (dmfs = 0), and children with and without severe ECC showed a significant difference in MS counts ($p = 0.0009$) and caries experience ($p = 0.0000$), but TPC did not differ between groups ($p = 0.6015$). Thus, MS counts and dmfs scores increased with the severity of the disease, regardless of the child's nutritional status. A statistically significant positive correlation was found between age and MS counts ($p = 0.0308$); age and dmfs scores ($p = 0.0000$); age and TPC ($p = 0.0078$). Caries experience correlated positively with MS counts ($p = 0.0002$). However, TPC did not correlate with caries experience ($p=0.5651$) or MS levels ($p=0.2162$) among healthy or malnourished children. A differential association between dmfs scores and age was not observed after a combined analysis of these two variables among children in GN, GI, GII and GIII.

Comparisons between children with different levels of malnutrition (GI, GII, GIII) and the GN group showed a statistically significant difference in age ($p = 0.0000$) and TPC ($p = 0.0000$), but no differences in MS counts ($p = 0.5406$) or caries experience ($p = 0.6094$) were observed (table 2). Age ($p = 0.5380$), salivary MS counts ($p = 0.4016$), TPC ($p = 0.2035$)

and caries experience ($p = 0.3953$) did not differ between children that were mildly (GI) and those that were moderately (GII) malnourished. Nevertheless, GIII children were the youngest among all groups (GI/GII, $p = 0.0063$; GN, $p = 0.0000$) (table 3), and presented higher TPC than children in GI/GII groups ($p = 0.0002$), but no statistical difference in TPC was observed when comparing GIII and GN groups ($p = 0.5309$) (table 4). Hence, severely malnourished children presented salivary total protein concentrations similar to the levels observed among nourished and healthy children (table 5).

Discussion

In any given population ECC is linked to unique risk factors including high salivary levels of MS and frequent consumption of liquids containing fermentable carbohydrates [Ersin et al., 2006]. MS transmission occurs early in life through the mother's saliva, soon after dental eruption, since these bacteria are usually not cultured from the oral cavity of pre-dentate children [Seow, 1998]. Thus, the earlier the infection and the more elevated the MS counts in saliva, the highest are the chances that the carious process will be initiated in a child at young age [Ersin et al., 2006]. In agreement with these findings, we have found a statistically significant correlation between caries experience and MS counts, regardless of the child's nutritional status. However, no association between MS levels and grades of malnutrition was observed. Previously, Li et al. [1994] assessed salivary MS levels and malnutrition status among 3-4 year old children. The author's main objective was to investigate the association between salivary MS levels and enamel hypoplasia, however dental caries was also evaluated and a significant association between MS levels and enamel hypoplasia was detected, but no significant correlation was found between numbers of MS and body height or body weight. Johansson et al. [1992] studied the effect of chronic PEM on salivary flow and caries susceptibility in a group of sixty-eight, 8-12 year-old children, of which 34 were severely/moderately malnourished and the others were classified as nourished/mildly malnourished group. When considering the number of highly contaminated ($>10^6$ UFC/mL) children in both groups, 74% of the severely/moderately and 65% of the nourished/mildly malnourished children had high levels of MS in saliva. In their study all participants were contaminated with MS, and no difference in salivary MS levels was found between groups. Therefore, in agreement with our findings, nutritional status did not influence MS contamination.

In the present study no significant difference in dmfs scores or severity of ECC was observed when comparing children with different grades of malnutrition (GI, GII, GIII) and those who were nourished (GN). Thus, the presence of PEM was not a relevant predisposing factor in the development and manifestation of the disease. Cleaton-Jones et al. [2000] studied the relationship between nutritional status and dental caries in 2728 children aged 4-5 years. Although a statistically significant trend in the increase of dmfs scores with increased wasting (low weight-for-height) was observed, no significant rise in caries prevalence was noted in this population. In agreement with our data, the authors concluded that nutritional status was not a

clinically significant factor in caries prevalence and experience. Nevertheless, previous work has suggested a relationship between PEM and increased caries experience [Alvarez et al., 1990; 1993; Johansson et al., 1994; Petti et al., 2000], and it has been proposed that a single mild to moderate malnutrition episode on the first year of life may result in higher caries rates in the primary and permanent dentitions [Alvarez, 1995]. Interestingly, previously described confounders frequently observed in a malnourished population, such as delayed tooth eruption and higher prevalence of enamel hypoplasia could not explain our findings. Enamel hypoplasia was not commonly observed in the present population, with a prevalence of only 2.5% in the malnourished groups, significantly below the prevalence among nourished children. Previous studies have described a higher prevalence of this malformation, ranging from approximately 20% [Li et al., 1996], 30% [Infante and Gillespie, 1977], 40% [Sweeney et al., 1971] to 50% [Li et al., 1994]. In addition, in the present study plotting of dmfs scores as a function of age did not demonstrate the previously described shift to the right of the age distribution curve of caries among malnourished children [Alvarez et al., 1988; Alvarez, 1995], suggesting that caries risk increment was associated with age regardless of the child's nutritional condition.

A variety of factors are capable of influencing TPC measurements, such as geographic location, nutritional habits and the method of saliva sampling [Dezan et al., 2002]. Most salivary proteins are expressed during the first month of life, varying with age, and concentrations tend to be higher in the first days of life, reducing during the first month, maintaining constant levels during the first year [Ruhl et al., 2005], with an observed tendency towards a linear increase with age [Ben-Aryeh et al., 1990]. Thus, changes in salivary composition of infants during the first 12 months of life may be an expression of a functional process of development and maturation of the human salivary glands, as part of the child's general growth and development [Ben-Aryeh et al., 1990]. Apparently, TPC is not influenced by dental eruption [Ruhl et al., 2005] and no difference between genders has been previously described [Ben-Aryeh et al., 1990; Dezan et al., 2002].

We have measured total protein concentration in saliva in an attempt to verify if the presence of PEM and/or ECC alone would modify general protein levels. Our results demonstrated a lack of correlation between TPC and ECC, as has been previously reported by Farias and Bezerra [2003]. The authors found no differences in TPC among 12-47 months-old children with or without dental caries. Conversely, Kargül et al. [1994] observed a linear rise in TPC with an increasing number of carious surfaces. We believe this difference was possibly due to the wide discrepancy in children's age, since over 50% of their sample included 6-13 year-old children and age factor may significantly influence TPC [Ben-Aryeh et al., 1990]. Presently, TPC increased with age, and was significantly elevated among severely malnourished children, in spite of GIII children being considerably younger. This finding suggests that severe malnutrition plays a determining role in the concentration of salivary proteins, surpassing the age-factor influence. In this group of children TPC was equivalent to the levels identified among nourished children. However, mildly and moderately malnourished children had equally lower TPC. We believe

this phenomenon could be a sign of salivary gland destruction, possibly present among severely malnourished children as has been previously suggested [Ibrahim et al., 1978]. Conversely, in spite of mild and moderately malnourished children being also significantly younger than the nourished group, TPC wasn't elevated among these children, but a significant reduction was noted, implying that while malnutrition isn't severe, age remains a stronger determinant of TPC in saliva. In conclusion, our results suggest that in the absence of high levels of enamel hypoplasia and associated delayed dental eruption, nutritional status alone does not predispose malnourished children to a higher risk of experiencing dental caries in early childhood.

Acknowledgements

This work was partly funded by Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

Referências

- AAPD 2007-08 definitions, oral health policies, and clinical guidelines: Policy on early childhood caries (ECC): classifications, consequences, and preventive strategies. www.aapd.org/media/Policies_Guidelines/P_ECCClassification.pdf.
- Alvarez JO, Caceda J, Woolley TW: A longitudinal study of dental caries in the primary teeth of children who suffer from infant malnutrition. *J Dent Res* 1993;72:1573-1576.
- Alvarez JO, Eguren JC, Caceda J, Navia JM: The effect of nutritional status on the age distribution of dental caries in the primary teeth. *J Dent Res* 1990;69:1564-1566.
- Alvarez JO, Lewis CA, Saman C, Caceda J, Montalvo J, Figueroa ML: Chronic malnutrition, dental caries, and tooth exfoliation in Peruvian children aged 3-9 years. *Am J Clin Nutr* 1988;48:368-372.
- Alvarez JO. Nutrition, tooth development, and dental caries. *Am J Clin Nutr* 1995;61:410S-416S.
- Ayhan H, Suskan E, Yildirim S: The effect of nursing or rampant caries on height, body weight, and head circumference. *J Clin Pediatr Dent* 1996;20:209-212.
- Ben-Aryeh H, Fisher M, Szargel R, Laufer D: Composition of whole unstimulated saliva of healthy children: changes with age. *Archs oral Biol* 1990;35:929-931.
- Bowden GH: Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? *Community Dent Oral Epidemiol* 1997;25:76-81.
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- Cleaton-Jones P, Richardson BD, Granath L, Fatti LP, Sinell R, Walker AR, Mogotsi M: Nutritional status and dental caries in a large sample of 4- and 5-year-old South African children. *S Afr Med J* 2000;90:631-635.

Dezan CC, Nicolau J, Souza DN, Walter LRF: Flow rate, amylase activity, and protein and sialic acid concentrations of saliva from children aged 18, 30 and 42 months attending a baby clinic. *Archs oral Biol* 2002;47:423-427.

Dutra-De-Oliveira JE, Marchini JS: *Ciências nutricionais*. São Paulo, SP, Sarvier, 2003.

Ersin NK, Eronat N, Congulu D, Uzel A, Aksit S: Association of maternal-Child characteristics as a factor in early childhood caries and salivary bacterial counts. *J Dent Child* 2006;73:105-111.

Farias DG, Bezerra ACB: Salivary antibodies, amylase and protein from children with early childhood caries. *Clin Oral Invest* 2003;7:154-157.

Gold OG, Jordan HV, van Houte J: A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Archs oral Biol* 1973;18:1357-1364.

Hallett KB, O'Rourke PK: Pattern and severity of early childhood caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 2006;34:25-35.

Ibrahim AM, El-Hawary MF, Sakr R: Protein-calorie malnutrition (PCM) in Egypt immunological changes of salivary protein in PCM. *Z Ernährungswiss* 1978;17:145-152.

Infante PF, Gillespie GM: Enamel hypoplasia in relation to caries in Guatemalan children. *J Dent Res* 1977;56:493-498.

Johansson I, Lenander-Lumikari M, Saelström A-K: Saliva composition in Indian children with chronic protein-energy malnutrition. *J Dent Res* 1994;73:11-19.

Johansson I, Saelström A-K, Rajan BP, Parameswaran A: Salivary flow and dental caries in Indian children suffering from chronic malnutrition. *Caries Res* 1992;26:38-43.

Kargül B, Yarat A, Tanboga I, Emekli N: Salivary protein and some inorganic element levels in healthy children and their relationship to caries. *J Marmara Univ Dent Fac* 1994;2:434-440.

Li Y, Navia JM, Bian JY: Caries experience in deciduous dentition of rural Chinese children 3-5-years-old in relation to the presence or absence of enamel hypoplasia. *Caries Res* 1996;30:8-15.

Li, Y, Navia JM, Caulfield PW: Colonization by mutans streptococci in the mouths of 3- and 4-year-old Chinese children with or without enamel hypoplasia. *Archs oral Biol* 1994;39:1057-1062.

Low W, Tan S, Schwartz S: The effect of severe caries on the quality of life in young children. *Pediatr Dent* 1999;21:325-326.

Ölmez S, Uzamis M, Erdem G: Association between early childhood caries and clinical, microbiological, oral hygiene and dietary variables in rural Turkish children. *Turk J Pediatr* 2003;45:231-236.

Pelletier DL, Frongillo EA Jr, Schroeder DG, Habicht JP: The effects of malnutrition on

child mortality in developing countries. *Bull World Health Organ* 1995;73:443-448.

Petti S, Cairella G, Tarsitani G: Rampant early childhood dental decay: an example from Italy. *J. Public Health Dent* 2000;60:159-166.

Psoter WJ, Reid BC, Katz RV: Malnutrition and dental caries: a review of the literature. *Caries Res* 2005;39:441-447.

Ramos-Gomez FJ, Weintraub JA, Gansky AS, Hoover CI, Featherstone JDB: Bacterial, behavioral and environmental factors associated with early childhood caries. *J Clin Pediatr Dent* 2002;26:165-173.

Ruhl S, Rayment SA, Scmalz G, Hiller K-A, Troxler RFF: Proteins in whole saliva during the first year of infancy. *J Dent Res* 2005;84:29-34.

Ruoff KL, Whiley RA, Beighton D: Streptococcus; in Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JW, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds): *Manual of clinical microbiology*. Washington DC, ASM Press, 2003, pp 405-421.

Schwartz S: A one year statistical analysis of dental emergencies in a pediatric hospital. *J Can Dent Assoc* 1994;60:959-968.

Seow WK. Biological mechanisms of early childhood caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 1998;26:8-27.

Sweeney EA, Saffir AJ, Leon R: Linear hypoplasia of deciduous incisor teeth in malnourished children. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1971;24:29-31.

Thibodeau EA, O'Sullivan DM: Salivary mutans streptococci and caries development in the primary and mixed dentitions of children. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999;27:406-412.

WHO Multicentre Growth Reference Study Group: WHO child growth standards based on length/height; weight and age. *Acta Paediatr* 2006;Suppl 450:76-85.

WHO, Department of Nutrition for Health and Development: Nutrition for health and development: a global agenda for combating malnutrition. WHO, 2000. http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_NHD_00.6.pdf.

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 280/2006

Fortaleza, 02 de junho de 2006

Protocolo nº 94/06

Pesquisador responsável: Ana Catarina de Miranda Mota

Deptº./Serviço: Instituto de Prevenção a Desnutrição e a Excepcionalidade

Título do Projeto: “Estudo do perfil de proteínas salivares de crianças desnutridas com cárie primeira infância”

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução nº 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 18 de maio de 2006.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório parcial e final do referido projeto.

Atenciosamente,

Dr. Fernando A. Frota Bezerra
Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 30/2007

Fortaleza, 26 de janeiro de 2007

Protocolo nº 94/06

Pesquisador responsável: Ana Catarina de Miranda Mota

Deptº./Serviço: Instituto de Prevenção a Desnutrição e a Excepcionalidade

Título do Projeto: "Análise do perfil de proteínas salivares experiência de cárie em níveis de *Streptococcus mutans* em população de crianças desnutridas"

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução nº 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou a emenda do projeto supracitado na reunião do dia 11 de janeiro de 2007.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório parcial e final do referido projeto.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em tinta preta, com uma linha decorativa que se estende para baixo.

Dr. Fernando A. Frota Bezerra
Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC